

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Irapuato

**Estudio del Minicromosoma de PepGMV durante su Ciclo
Infectivo en *Capsicum annuum***

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de

Biología de plantas

Presenta

Esther Adriana Cenicerros Ojeda

Dirigida por

Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante

Irapuato, Gto. México

Junio 2016

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Genética del **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**, Unidad Irapuato. Bajo la dirección del **Dr. Rafael Francisco Rivera Bustamante** en el laboratorio de **Virología Vegetal**.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 204167 otorgada durante el desarrollo de la presente Tesis doctoral en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato.

Agradecimientos

Al mi Profesor Dr. Rafael F. Rivera Bustamante, por aceptarme en su grupo de trabajo y darme la libertad de aprender.

Al Dr. Edgar A. Rodríguez Negrete, por sus observaciones y discusiones que me ayudaron a ampliar mi visión sobre el problema.

Al Profesor Dr. Jean-Philippe Vielle Calzada, por sus multiples comentarios, críticas y sugerencias que enriquecieron la presente tesis.

Al Profesor Dr. Raúl Álvarez Venegas, por tener su puerta abierta para asesorarme siempre que necesite.

A mi comité tutorial, Dr. Raúl Álvarez Venegas, Dr. Octavio Martínez de la Vega, Dra. Laura Silva Rosales, Dr. Jean-Philippe Vielle Calzada y el Dr. Robert Winkler, por sus observaciones y sugerencias.

Al Profesor, Dr. Luis E. González de la Vara y a Barbara Lino Alfaro, por la asesoría brindada en la técnica de separación por gradiente de sacarosa, además de facilitarme el equipo para llevarla acabo.

La Dra. Erandi Vargas Ortíz, por sus observaciones y comentarios en este trabajo.

A Ana Mayela Ornelas Morín, por su ayuda técnica.

A Alicia Chagoya López, por su ayuda en los análisis de proteínas.

A Dora Elia Anguiano Jaime, por su eficiente ayuda en todo los trámites administrativos desde mi primer día como estudiante del CINVESTAV.

A mis hermanitos del GeminiLab: Marco, Diana, Ruth, Roberto, Magda, Lucy, Myriam, Rocio y Jose Luis, por sus críticas y observaciones en mi trabajo, pero gracias principalmente por la agradable compañía.

A toda mi familia, principalmente a mi máma y mi hermanita por su amor y apoyo incondicional.

A mi familia Irapuatense, Erandi, Maye, Crys, Ari, Esme, Adrian y Dalia, por la motivación, las porras, el cariño y el apoyo psicológico (siempre que fue necesario).

A los compañeros integrantes de los equipos de Futbol y Voleibol, Gaby, Natzul, Selene, Emmanuel y GeminiLab, por los buenos momentos de desestrés.

A mi nuevo Lab, de Proyectos Especiales II. Principalmente a la Dr. June Simpson, por aceptarme en su grupo de trabajo, para llevar acabo un nuevo reto.

Gracias... ¡Totales!

Índice General

Índice de Figuras	4
Lista de Abreviaciones	5
Resumen	6
Abstract	7
I. Introducción	8
1.1 Geminivirus	8
1.1.1 Ciclo infeccioso de los Begomovirus	9
1.1.2 Minicromosoma Viral	12
1.1.3 Transcripción viral	17
1.1.4 Replicación viral	18
1.2 Estructura de la Cromatina y Epigenética	20
1.2.1 Nucleosomas	21
1.2.2 Modificaciones Post-traduccionales de Histonas	23
1.2.3 Metilación del DNA	25
1.3 Interacción Geminivirus – Planta	29
1.3.1 Remisión de síntomas (Recuperación).	30
II. Hipótesis	35
III. Objetivos	35
3.1 Objetivo general	35
3.2 Objetivos particulares	35
IV. Materiales y Métodos	36

4.1	Inoculación de plantas de chile	36
4.2	Digestión con nucleasa micrococcal e hibridación tipo Southern.	36
4.3	Purificación del minicromosoma de PepGMV	37
4.4	Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina	38
4.5	Sedimentación del minicromosoma viral por medio de gradientes discontinuos de sacarosa	39
4.6	Cuantificación del DNA viral por PCR tiempo real.	40
4.7	Cuantificación absoluta de ssDNA y dsDNA viral	41
4.8	Análisis de metilación del DNA viral por Bisulfito.	41
4.9	Identificación de las proteínas aisladas de MCV de Síntomas y Remisión	42
V.	Resultados	43
5.1	Diferencias en la estructura del minicromosoma viral proveniente de tejido en síntomas y en remisión	43
5.2	Extracto enriquecido con minicromosoma viral	45
5.3	Comparación de poblaciones de minicromosoma viral de tejido sintomático y en remisión.	53
5.4	Cuantificación de dsDNA y ssDNA viral de F1S y F6R	57
5.5	Análisis de los niveles de metilación del minicromosoma viral de F1S y F6R por Bisulfito	58
5.6	Modificaciones de histonas en el minicromosoma viral de F1S y F6R	61
VI.	Discusión	68
VII.	Conclusión	80
VIII.	Perspectivas	81
IX.	Referencias	82
X.	ANEXOS	94

Índice de Tablas y Figuras

TABLA 1. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS.....	24
TABLA 2. ANOTACIÓN POR FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS AL MINICROMOSOMA DE SÍNTOMAS Y REMISIÓN	66
Figura 1. Mapa genómico PepGMV.	9
Figura 2. Ciclo infeccioso de los begomovirus.	11
Figura 3. Micrografía electrónica de minicromosoma viral.....	17
Figura 4. Esquema de los transcritos del genoma viral.	18
Figura 5. Modelo de replicación del DNA geminiviral por circulo rodante (RCR).	19
Figura 6. Estructura de la cromatina.	21
Figura 7. Esquema de la Ruta “Canónica” de Metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM).	28
Figura 8. Planta de Chile infectada con PepGMV mostrando remisión de síntomas.	32
Figura 9. Ensayo de sensibilidad a la nucleasa micrococcal del minicromosoma obtenido de tejido de plantas sintomáticas y en remisión.	45
Figura 10. Extracción de MCV de núcleos obtenidos de tejido sintomático usando NaCl.....	47
Figura 11. Extracción de MCV usando diferentes estabilizadores de cromatina.....	48
Figura 12. Extracción de MCV usando detergentes.	49
Figura 13. Extractos de núcleos tratados con Sarkosyl, enriquecidos con minicromosoma viral.	51
Figura 14. Análisis de metilación de cccDNA viral por digestión con McrBC.	52
Figura 15. Identificación de dos poblaciones virales en plantas infectadas con PepGMV.	56
Figura 16. Cuantificación de DNA viral de cadena sencilla (ss) y cadena doble (ds) en las fracciones F1S y F6R.....	58
Figura 17. Análisis de alta resolución de los niveles de metilación de las muestras F1S y F6R.....	62
Figura 18. Análisis de modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a activación o represión en las poblaciones de minicromosoma viral de las fracciones F1S y F6R.....	62
Figura 19. Esquema de conjuntos de las proteínas asociadas al minicromosoma en síntomas y remisión	64
Figura 20. Clasificación por función biológica de las proteínas asociadas al minicromosoma de Síntomas y Remisión.	67
Figura 21. Esquema que muestra el estado de actividad viral vs efecto en el fenotipo observado (sintomático).	77
Figura 22. Modelo Propuesto para explicar la actividad del minicromosoma viral (MCV) de PepGMV durante su ciclo infeccioso en <i>Capsicum annuum</i>	79

Lista de Abreviaciones

AbMV: *Virus del mosaico del abutilon, Abutilon mosaic virus.*

CP: Proteína de la cápside, Coat protein.

Dpi: Días pos-inoculación.

dsDNA: DNA de doble cadena, double stranded DNA.

h.v. Hojas verdaderas.

H3K4me3: Tri-metilación en la lisina 4 de la histona H3.

H3K9me2: Di-metilación en la lisina 9 de la histona H3.

IR: Región intergénica.

MP: Proteína del movimiento viral, movement protein.

NSP: Proteína de transporte nuclear, nuclear shuttle protein.

nt: Nucleótidos.

pb: Pares de bases.

PepGMV: *Virus del mosaico dorado del chile, Pepper golden mosaic virus.*

PHYVV: *Virus huasteco de la vena amarilla del chile, Pepper huasteco yellow vein virus.*

PTGS: Silenciamiento génico post-transcripcional, Post-transcriptional gene silencing.

RCR: Replicación por círculo rodante, Rolling circle replication.

REn: Proteína potenciadora de la replicación, Replication Enhancing protein

Rep: Proteína asociada a la replicación viral, replication-associated protein

ssDNA: DNA de cadena sencilla, single stranded DNA.

TGS: Silenciamiento génico transcripcional, Transcriptional gene silencing.

TrAP: Proteína trans-activadora de la transcripción, Transcriptional trans-activator protein

Resumen

Los Geminivirus son importantes patógenos de plantas y se caracterizan por tener un genoma de DNA circular de cadena sencilla (ssDNA). Dentro del núcleo de la célula infectada se sintetiza la cadena complementaria formando DNA de doble cadena (dsDNA), el cual se asocia a histonas formando un minicromosoma. Los estudios sobre la estructura y modificaciones del minicromosoma viral se han visto limitados por la baja concentración obtenida de este complejo, además del bajo número de células que son infectadas por el virus. En nuestro grupo de trabajo, previamente se ha caracterizado un fenómeno de remisión de síntomas, observado en la interacción de plantas de Chile *Capsicum annuum* con el *virus del mosaico dorado del Chile* (PepGMV). Tal fenómeno está asociado con la reducción de los niveles de DNA y RNA viral, además de la presencia de siRNAs virales y del incremento en los niveles de metilación del DNA viral. Un estudio inicial, basado en la sensibilidad a nucleasa micrococcal, mostró diferentes estructuras de la cromatina viral entre tejido sintomático y en remisión. Usando el sistema Chile-PepGMV, hemos desarrollado una metodología para obtener fracciones enriquecidas de minicromosoma viral que no afecta su estructura básica. Usando esta metodología, se logró caracterizar dos poblaciones de minicromosoma viral en plantas infectadas. El minicromosoma aislado de tejido sintomático muestra una conformación relajada y está asociado a marcas de activación (H3K4me3). Además, presenta bajos niveles de metilación de DNA. El minicromosoma aislado de tejido en remisión, tiene una estructura compacta, asociada a marcas de represión (H3K9me2) y presenta altos niveles de metilación del DNA. Finalmente, estudios por espectrometría de masas sugieren la asociación de proteínas involucradas en el silenciamiento génico transcripcional (e.g. DICER3, AGO1/2/4, RDB2, KYP, CMT3 y MET3) con el minicromosoma viral.

Abstract

Geminiviruses are important plant pathogens characterized by circular, single-stranded DNA (ssDNA) genomes. In the nuclei of infected cells, viral double stranded DNA (dsDNA) is associated with histones to form a minichromosome. Studies on virus minichromosome structure and genome modifications have been hindered by the low concentration of these complexes due to the low number of infected cells especially in phloem-limited viruses. We have previously characterized a “recovery” phenomenon observed in pepper plants (*Capsicum annuum L.*) infected with *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) that is associated with a reduction of viral DNA and RNA levels, the presence of virus-related siRNAs, and an increase in the levels of viral DNA methylation. An initial micrococcal nuclease-based assay pinpointed the presence of different viral chromatin complexes present in symptomatic versus recovered tissues. Using the pepper-PepGMV system, we developed a methodology to obtain a viral minichromosome-enriched fraction that does not disturb the basic chromatin structural integrity, as evaluated by the detection of core histones. Using this procedure, we have characterized two populations of viral minichromosomes in PepGMV-infected plants. After further purification using sucrose gradient sedimentation, we also observed that minichromosomes isolated from symptomatic tissue show a relaxed conformation, are associated to a chromatin activation marker (H3K4me3), and present a low level of DNA methylation. The minichromosome population obtained from recovered tissue, on the other hand, sedimented as a compact structure, is associated to a chromatin repressive marker (H3K9me2), and presents a high level of DNA methylation. Last, mass spectrometry analysis suggests the association of proteins involved in transcriptional gene silencing (DICER3, AGO1/2/4, RDB2, KYP, CMT3 y MET3) with the minichromosome.

I. Introducción

1.1 Geminivirus

Los geminivirus son partículas virales que infectan plantas de alto interés económico como son maíz, tomate, tomatillo, papa, algodón y chile, dejando pérdidas que pueden llegar hasta del 100% de la producción. Esto los convierte en un problema serio en lo que respecta a seguridad alimentaria (Rojas et al., 2005). Los geminivirus se caracterizan por tener un genoma compuesto por una o dos moléculas de DNA circular de cadena sencilla (ssDNA) de 2.6 – 3.0 Kb. La familia *Geminiviridae* se divide en siete géneros (*Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Topocuvirus* and *Turncurtovirus*), con base en el insecto vector que los transmite y su organización genómica (Adams & King, 2013).

El género *Begomovirus* es el que contiene la mayoría de las especies que se conocen hasta ahora. Miembros de este género han sido encontrados en México y han devastado cultivos importantes. En una asociación sinérgica, el *virus huasteco de la vena amarilla del chile* (*Pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV) y el *virus del mosaico dorado del chile* (*Pepper golden mosaic virus*, PepGMV) han provocado pérdidas hasta del 95% del cultivos de chile (Rentería-Canett et al., 2011; Méndez-Lozano et al., 2003).

La mayoría de los begomovirus tiene su genoma dividido en dos componentes (Fig. 1). En el componente A se codifican: en sentido del virión, la proteína de la cápside (CP); en sentido complementario, la proteína iniciadora de la replicación (Rep), la proteína transactivadora de la transcripción (TrAP) de CP y MP

(Proteína de Movimiento), y la proteína potenciadora de la replicación (REn). En el componente B se codifican: en sentido del virión, la proteína de transporte nuclear (NSP); y en sentido complementario, la proteína de movimiento (MP) (Fig. 1).

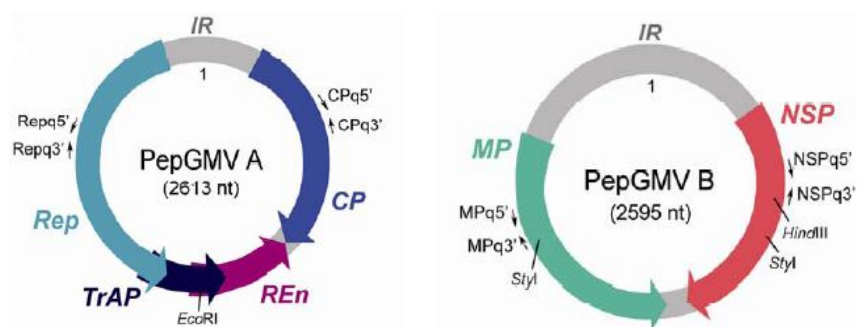


Figura 1. Mapa genómico PepGMV. Este mapa muestra los dos componentes con seis marcos de lectura abiertos (en color) y en gris las regiones intergénicas (IR). (Figura tomada de Carrillo-Tripp et al., 2007)

1.1.1 Ciclo infeccioso de los Begomovirus

La infección inicia cuando la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), portadora de las partículas virales, introduce su estilete en el sistema vascular de la planta para alimentarse de la savia y deposita el virus en la planta. El virus llega a las células acompañantes del floema. Hasta la fecha no se conoce, si es la partícula completa o solo el ssDNA viral el que entra al núcleo de la célula, probablemente por los poros nucleares. La evidencia indica que hay partículas virales dentro del núcleo de la células, pero no se precisa si lo que observan es la partícula que entró al núcleo o son las partículas nuevas generadas en la infección (Russo et al., 1980). Por otro lado, análisis de la estabilidad de la estructura de la cápside sugieren, que difícilmente la partícula viral podría expulsar el ssDNA (Kittelmann & Jeske, 2008).

El ssDNA viral es liberado del virión y se sintetiza la cadena complementaria produciendo DNA viral de doble cadena (dsDNA). El dsDNA viral se asocia con histonas de la célula hospedera, generando la estructura tipo cromatina, conocido como minicromosoma viral (Pilartz & Jeske, 1992; Pilartz & Jeske, 2003). Esta conformación de minicromosoma sirve para proteger el DNA, regular la transcripción y replicación viral. Después de conformarse el minicromosoma viral, comienza la transcripción de los genes que dan lugar a las proteínas que iniciaran la replicación viral, Rep y REn. El DNA viral se replica principalmente por mecanismo de circulo rodante (RCR), generando polímeros de ssDNA que son cortados por la proteína viral Rep y formando así monómeros circulares de ssDNA viral (Stenger et al., 1991). Estas moléculas de ssDNA pueden encapsidarse o reiniciar el ciclo de replicación. El virus puede moverse para iniciar la infección de las células vecinas o células distantes viajando por el floema. El DNA viral sale del núcleo al citoplasma del hospedero con la ayuda de la proteína viral de transporte nuclear (NSP). El complejo DNA-NSP llega al citoplasma donde lo espera la proteína del movimiento viral (MP). MP se une al complejo DNA-NSP y este es llevado hasta el plasmodesmo, donde es transportado a la célula vecina (Hanley-Bowdoin et al., 2013). Aún se desconoce el tipo de molécula de DNA viral que es transportada, pero estudios *in vitro* usando la técnica de retardo en la migración del DNA en geles de acrilamida, muestran que la proteína viral NSP tiene mayor afinidad por dsDNA que por ssDNA (Hehnle et al., 2004; Rojas et al., 1998). Por otro lado, en ensayos de afinidad se demostró que la proteína NSP tiene fuerte afinidad por ssDNA (Pascal et al., 1994). También se ha reportado, en la interacción de *Solanum lycopersicum* (tomate) con el geminivirus *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) que las proteínas

virales NSP y MP interactúan *In vitro* con la histona H3 y el complejo se ha co-localizado en el citoplasma (Zhou et al., 2011). Por lo tanto, la molécula viral transportada puede ser: ssDNA o dsDNA (lineal o circular), el propio minicromosoma, o una combinación de estos (Fig. 2).

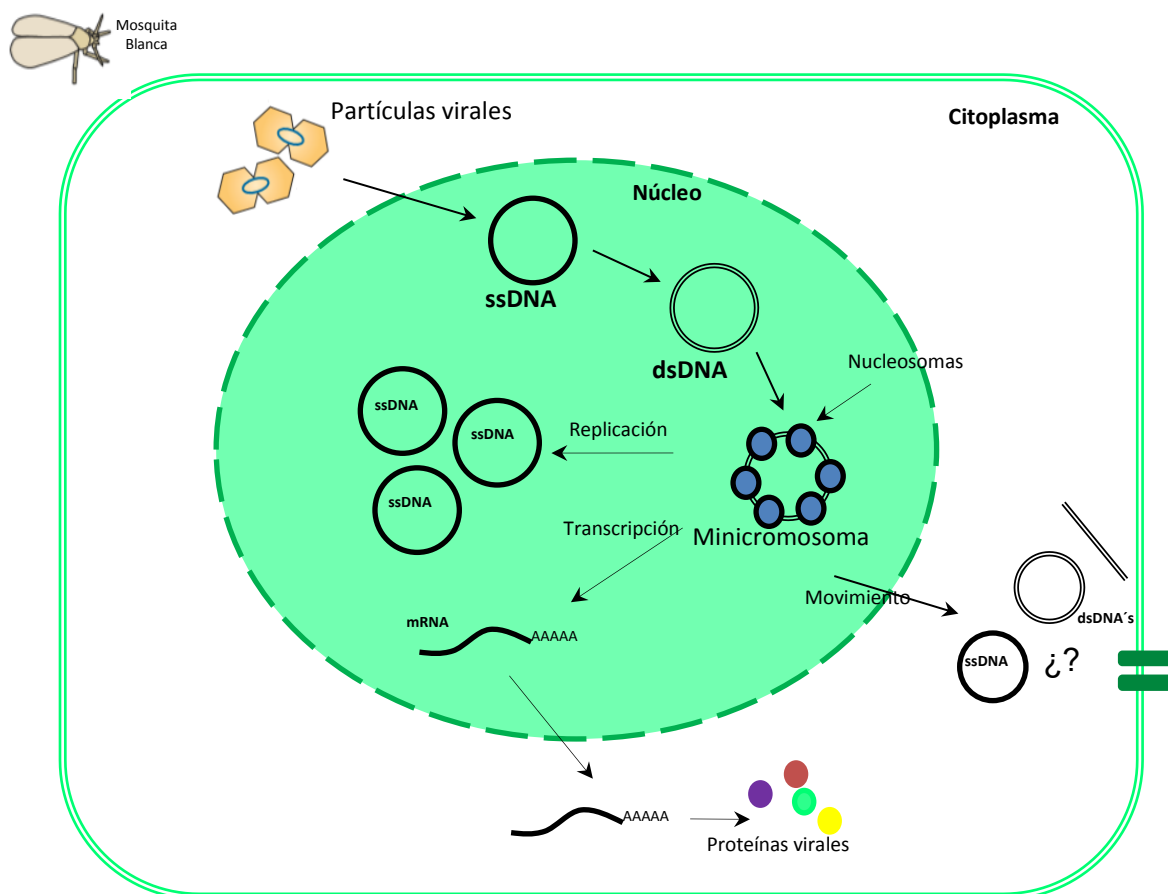


Figura 2. Ciclo infeccioso de los begomovirus. La infección inicia cuando el virión (ssDNA) entra al núcleo y se genera la cadena complementaria, formando el dsDNA viral (forma replicativa). El dsDNA se une a nucleosomas, formando la estructura conocida como, minicromosoma viral. El minicromosoma es usado como templado para la transcripción y replicación. La RNA polimerasa II del hospedero transcribe los genes virales, y se produce la proteína iniciadora de la replicación (Rep). Rep es la encargada de iniciar la replicación del virus por círculo rodante (RCR). En la replicación se generan moléculas de ssDNA las cuales pueden, o irse a encapsidar o a reiniciar la replicación. La infección es propagada en la planta por el movimiento del DNA viral, del núcleo a las células vecinas o distantes (transportados por el floema) con la ayuda de dos proteínas, la proteína del movimiento nuclear (nuclear shuttle protein, NSP) y la proteína del movimiento (movement protein, MP). (Hanley-Bowdoin et al., 2013)

1.1.2 Minicromosoma Viral

El Minicromosoma es una estructura tipo cromatina que cuenta con un sitio de origen de replicación, y se replica de manera autónoma durante la división celular. Se han identificado minicromosomas con estructuras lineales y circulares (Murata, 2014). Hasta la actualidad se han observado dos tipos diferentes de minicromosomas: eucariotas y virales.

El tamaño de los minicromosomas eucariotas va de 0.2 a 8.4 Mb, mientras que el tamaño de un autentico cromosoma va de 25.3 a 38.0 Mb (Goyal et al., 2009). Además del tamaño, los minicromosomas eucariotas se distinguen de los auténticos cromosomas por las siguientes características: 1) no son esenciales para los organismos, 2) no se recombinan (con el resto de los cromosomas) y 3) su herencia es no mendeliana (N. Jones & Houben, 2003). Estos minicromosomas son estructuras comunes en la naturaleza (conocidos ahora como cromosomas B) y se encuentran en diversos organismos tales como: hongos, protozoarios, insectos, mamíferos y plantas (Camacho et al., 2000; Camacho, 2004).

Los minicromosomas o cromosomas B, están constituidos por: un centrómero, telómeros, transposones y genes (secuencia completa o fragmentos) (Birchler, 2015). Estos minicromosomas fueron considerados por largo tiempo, como elementos genéticamente inertes, pero ahora se tiene evidencia molecular que indica que estos elementos son transcripcionalmente activos (Houben et al., 2014). Por ejemplo, en la planta *Crepis capillaris* se detectaron transcritos de RNA ribosomal provenientes del minicromosoma o cromosoma B (Leach et al., 2005). Esta actividad transcripcional también se ha observado en minicromosomas de

mamíferos. En el venado *Capreolus pygargus*, se detectaron transcritos provenientes de los genes FPGT (Fucosa 1-fosfato guanililtransferasa) y TNNI3K (miembro de la familia de MAP cinasas) que se encuentran dentro del minicromosoma (Trifonov et al., 2013). Las ventajas evolutivas que puede otorgar a un organismo el tener o no minicromosomas aun se desconocen, pero algunos estudios han relacionado un efecto fenotípico con su presencia (Houben et al., 2014). Por ejemplo, semillas de *Allium schoenoprasum* que contenían minicromosomas en su genoma, mostraron una mayor capacidad para germinar en condiciones de sequia (16%), que las que no tenían minicromosomas (Holmes & Bougourd, 1991). En estudios con peces *Lithochromis rubripinnis*, se observó que el minicromosoma contenido en su genoma, tenía un efecto funcional sobre la determinación del sexo del organismo (Yoshida et al., 2011).

El minicromosoma viral está conformado por un sitio de origen de replicación y de genes implicados en los mecanismos de replicación y transcripción viral, además de genes que codifican para proteínas de la cápside y de proteínas involucradas en el movimiento intra y extra celular del virus (Noueiry et al., 1994; Whittaker & Helenius, 1998; Bock et al., 2001; Taylor & Knipe, 2004; Belloni et al., 2009; Levrero et al., 2009;). El genoma de DNA viral entra al núcleo de la célula hospedera y estando ahí, se asocia con proteínas histonas (provenientes del hospedero), formando nucleosomas, y esta estructura es conocida como minicromosoma viral (Bellard et al., 1976; Menissier et al., 1983; Pilartz & Jeske, 1992).

El minicromosoma viral difiere del minicromosoma de eucariotas, en varios aspectos importantes: 1) es indispensable para llevar a cabo el ciclo viral, 2) el mayor

porcentaje de su secuencia contiene genes funcionales y 3) es el genoma total del virus (Sogo et al., 1986; Bock et al., 2001). El *minicromosoma* viral solo es referido así, por su tamaño, porque resulta ser extremadamente pequeño cuando es comparado con los cromosomas del organismo hospedero (Griffith, 1975), pero en realidad se debería referir a él como **Cromosoma Viral**, pero como ya se ha adoptado por la comunidad académica el término *minicromosoma viral*, lo seguiremos usando en el presente trabajo.

La formación de minicromosoma es una estrategia usada por varios virus con genoma de DNA. A la fecha se tiene evidencia experimental de la formación de esta estructura de minicromosoma en los siguientes virus: el *Virus 40 de simios* (*Simian virus 40*; SV40)(Sogo et al., 1986), *Virus de la hepatitis B* (*Hepatitis B virus*; HBV)(Bock et al., 2001), *Virus del herpes simple* (*Herpes simplex virus*; HSV)(Pignattii & Cassai, 1980), *Virus del mosaico de la coliflor* (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV)(Olszewski et al., 1982), el *Virus del mosaico del abutilón* (*Abutilon mosaic virus*; AMV)(Abouzid et al., 1988), entre otros. La estructura de minicromosoma formado por el virus SV40, además de ser la primera en ser observada al microscopio electrónico, fue la primera en donde se lograron identificar las proteínas que lo conformaban, las histonas: H2A, H2B, H3, H4 y H1 (Bellard et al., 1976; Sogo et al., 1986). Desde su descubrimiento se hipotetizó que la formación de esta estructura de minicromosoma era pieza clave para el éxito de la infección viral. Además, el minicromosoma viral ha sido una estructura que ha llamado la atención por su posible potencial para el estudio de los mecanismos de replicación y transcripción que se llevan a cabo en la cromatina eucariota. La

cromatina de eucariontes es una estructura de millones de pares de bases y compleja, y al tener el minicromosoma de virus SV40, una estructura similar pero pequeña (~3000 bases) y manejable, se abre la puerta para usar este minicromosoma para el análisis de la regulación de los diferentes mecanismos que están presentes en ella de manera coordinada, tal como la transcripción, reparación del DNA, recombinación y replicación.

El virus de la hepatitis B (HBV) es uno de los virus más estudiados por el impacto que tiene sobre la salud humana. La transcripción del minicromosoma del virus HBV es regulada por diversas modificaciones post-traduccionales de histonas (Levrero et al., 2009). Las modificaciones post-traduccionales de histonas que están implicadas con la activación transcripcional son: la acetilación de H3K9, H3K14, H3K18, H3K56, H4K5, H4K8, H4K13 y H4K16; la fosforilación de H3S10 y H3S28; la metilación de H3K4, H3K36, H3K79, H3R17, H3R23 y H4R3; la ubiquitinación de H2BK120, mientras que las modificaciones post-traduccionales de histonas que están implicadas con la represión transcripcional son: metilación en H3K9, H3K27 y H4K20; ubiquitinación en H2AK119; sumoilación en H2BK6, H2BK7 y H2AK126 (Sterner & Berger, 2000; Strahl & Allis, 2000; Pollicino et al., 2006; Turner, 2008; Levrero et al., 2009). Se ha observado a acetiltransferasas de histonas como CBP, p300 y PCAF/GCN5 y desacetilasas de histonas como HDAC1 y hSirt1, unidas al minicromosoma y junto con la proteína viral HBx coordinan la replicación viral (Belloni et al., 2009; Pollicino et al., 2006). El genoma del virus del herpes simple (HSV tipo 1) en estado de latencia, se encuentra asociado a histonas, como lo muestran los patrones de tamaños de los fragmentos característicos de DNA

nucleosomal, después de la digestión con nucleasa micrococcal (Deshmane & Fraser, 1989). Además, en el minicromosoma de HSV en latencia, se han encontrado diversas modificaciones post-traduccionales de histonas relacionadas a represión transcripcional (Cliffe et al., 2009). A diferencia del genoma viral en estado de latencia, el genoma en estado activo (lítico) muestra modificaciones post-traduccionales de histonas relacionadas a activación transcripcional. Además, al ser digerido con nucleasa micrococcal muestra principalmente fragmentos de tamaños heterogéneos y solo una pequeña cantidad de tamaño correspondiente al DNA nucleosomal (Lacasse & Schang, 2012). Todos estos datos en conjunto sugieren que la conformación del minicromosoma viral puede determinar su estatus de actividad, y que ésta a su vez, está siendo regulada por factores epigenéticos.

La estructura del minicromosoma formada por geminivirus no ha sido muy estudiada pero se ha observado que dsDNA viral de un tamaño de 2,6 kb puede acomodar de 10 a 15 nucleosomas (Abouzid et al., 1988). Observaciones hechas por microscopia electrónica revelaron un complejo núcleo-proteico en forma de rosario (“beads-on-a-string”), que contiene un promedio de 12 nucleosomas por dsDNA viral (Abouzid et al., 1988) (Figura 3). Esta estructura fue confirmada por análisis de patrones hechos por digestión con la nucleasa micrococcal y por el análisis de distribución de topoisómeros (Pilartz & Jeske, 2003). Todos estos estudios nos hacen pensar que el minicromosoma viral es dinámico, y que posiblemente varíe de un estado reprimido (13 nucleosomas) a estados activos, con una o más regiones promotoras libres (11-12 nucleosomas) o viceversa.

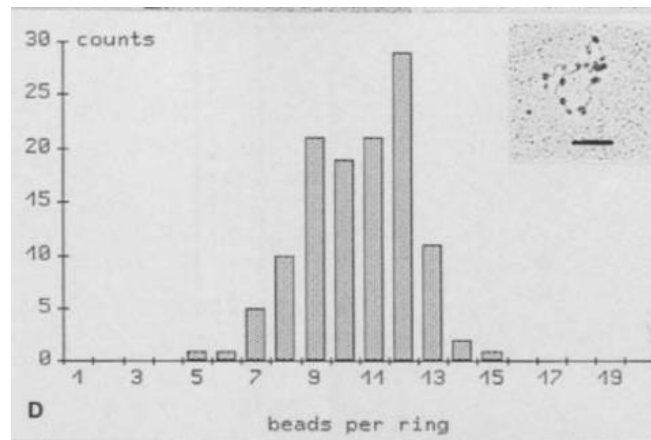


Figura 3. Micrografía electrónica de minicromosoma viral. Micrografía electrónica de minicromosoma geminiviral e histograma mostrando el número de nucleosomas detectado en la población de minicromosomas. (Figura de Abouzid et al., 1988).

1.1.3 Transcripción viral

La transcripción de los genes virales se lleva a cabo por la RNA polimerasa II de la célula hospedera. La RNA polimerasa reconoce las regiones promotoras que se encuentran río abajo de la caja TATA y sintetiza el RNA mensajero viral que se poliadenila. Como se puede observar en la Figura 4, los transcritos pueden traslaparse, porque la dirección de la transcripción es bidireccional, además los transcritos (que surgen del componente A, sentido complementario al virión) tienen múltiples marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frames*, ORF).

Por ejemplo, en TGMV (*Tomato golden mosaic virus*, geminivirus bipartita), el principal promotor (sentido complementario al virión) se encuentra en la región intergénica (del componente A) AL-62 (el número se refiere a la coordenada, tomando como 1 el nucleótido en el sitio de inicio de la transcripción)(Tu & Sunter, 2007). Este transcrito contiene los marcos de lectura para los tres genes Rep, TrAp y REn (Shung & Sunter, 2009). Hay evidencia de que solo Rep y REn pueden ser expresados por ese transcrito (Hanley-Bowdoin & Elmer, 1989). Además de AL-62,

también se encontraron dos promotores más: el primero denominado AL-1629 y el segundo, AL-1935. El promotor AL-1629 puede dar lugar a la expresión de las proteínas virales TrAp y REn, mientras que AL-1935 solo a REn (Shung et al., 2006; Shung & Sunter, 2009) (Fig. 4). Con estos datos se sugiere que los begomovirus bipartitas regulan la expresión de sus genes de una manera temporal, y se puede observar tres fases: las proteínas envueltas en la replicación (Rep y REn) son expresadas de manera temprana, TrAp de manera temprana/tardía mientras que CP y NSP de manera tardía (Shimada-Beltrán & Rivera-Bustamante, 2007).

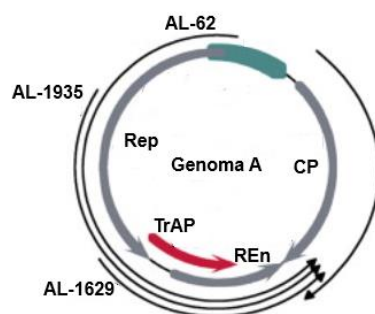


Figura 4. Esquema de los transcritos del genoma viral. Este diagrama muestra la dirección bidireccional de la transcripción, y los diferentes transcritos que pueden producirse (AL-62, AL-1935 y AL-1629)(Tu & Sunter, 2007).

1.1.4 Replicación viral

La replicación del DNA viral se lleva a cabo en tres fases: iniciación, elongación y terminación. La proteína Rep es la encargada de iniciar y terminar la replicación por círculo rodante (RCR). Rep cataliza el corte y ligación del DNA viral dentro de una secuencia de nonanucleótidos altamente conservada (TAATATT//AC) (Laufs et al., 1995; Orozco & Hanley-Bowdoin, 1996). Otra proteína viral que participa directamente en la replicación es REn, aunque no es una proteína esencial,

sí es un fuerte potenciador de la replicación (Settlage et al., 2005). El mecanismo de interacción de REn en la replicación viral aun no son claros, pero estudios *in vitro* muestran que REn puede potenciar la actividad ATPasa de Rep. Esto da la primera evidencia de que REn puede estar modulando la actividad de Rep (Pasumarthy et al., 2010). Los geminivirus no codifican para su propia DNA polimerasa, así que estos virus tienen que usar la maquinaria de replicación de la célula hospedera para la síntesis de DNA viral durante la fase de elongación (Hanley-Bowdoin, 2004) (Fig. 5)

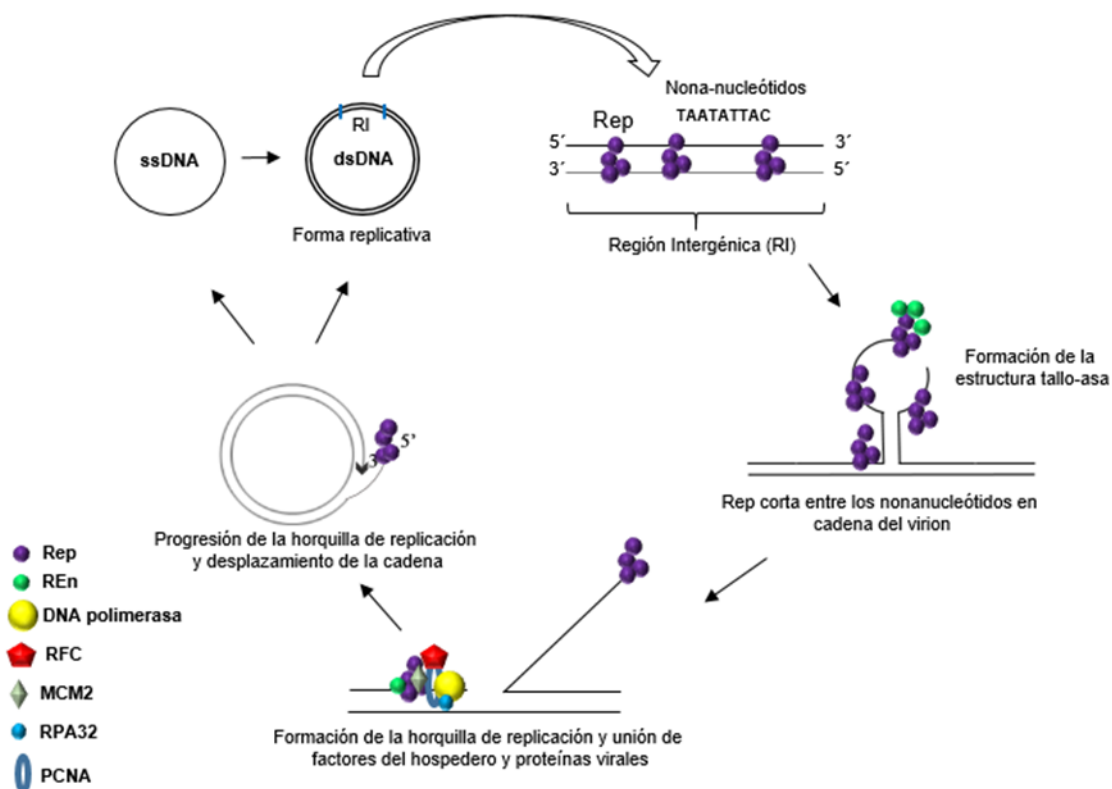


Figura 5. Modelo de replicación del DNA geminiviral por círculo rodante (RCR). El DNA viral de cadena sencilla (ssDNA) es convertido a DNA de doble cadena (dsDNA), que es la forma replicativa del genoma viral. La proteína iniciadora de la replicación (Rep) se une a los iterones, formando oligómeros, y corta dentro de la secuencia nonanucleotídica (T↓ACC) presente en la estructura tallo-asa que se forma en la región intergénica. Rep se une al extremo 5' de la cadena del virión y permite el ingreso hacia el extremo 3'-OH de la cadena complementaria de varios factores de replicación del hospedero, tales como RPA32, RFC, PCNA, DNA polimerasa y MCM2. La proteína viral REn también participa en el proceso de replicación. Después de sintetizar la copia completa del genoma

incluyendo la secuencia nonanucleotídica, ésta es cortada y ligada por Rep, liberando una molécula de ssDNA viral (virión)(Hanley-Bowdoin et al., 2013).

1.2 Estructura de la Cromatina y Epigenética

En células eucariotas el DNA genómico se encuentra asociado a múltiples proteínas formando un complejo con un extraordinario grado de compactación y organización física, conocido como **cromatina** (Rosa & Shaw, 2013). La cromatina es una estructura dinámica que puede estar sometida a diversos cambios; señales del ciclo celular, desarrollo o estrés, y que además, puede coordinar los mecanismos de replicación o transcripción o de reparación del DNA en regiones específicas (Conaway, 2012). Se han identificado un gran número de dominios en la cromatina, lo cual muestra que el genoma eucariota se encuentra altamente compartimentalizado, y estos segmentos son funcionalmente distintos. Por ejemplo, una fracción grande en el genoma, conocida como, dominios asociados a la lamina (Lamina-associated domains; LAD's), esta asociada con la membrana nuclear y correlaciona con un bajo nivel de expresión de los genes contenidos ahí, indicando que LAD's representan un ambiente represivo en la cromatina. Los bordes entre la eucromatina y la heterocromatina están delimitados por la proteína insulator CTCF. Además los promotores están orientados lejos de LAD's, sugiriendo que el posible mecanismo de LAD, es el confinamiento (Fig. 6A). La cromatina esta conformada por subunidades, llamadas nucleosomas (Luger et al., 1997).

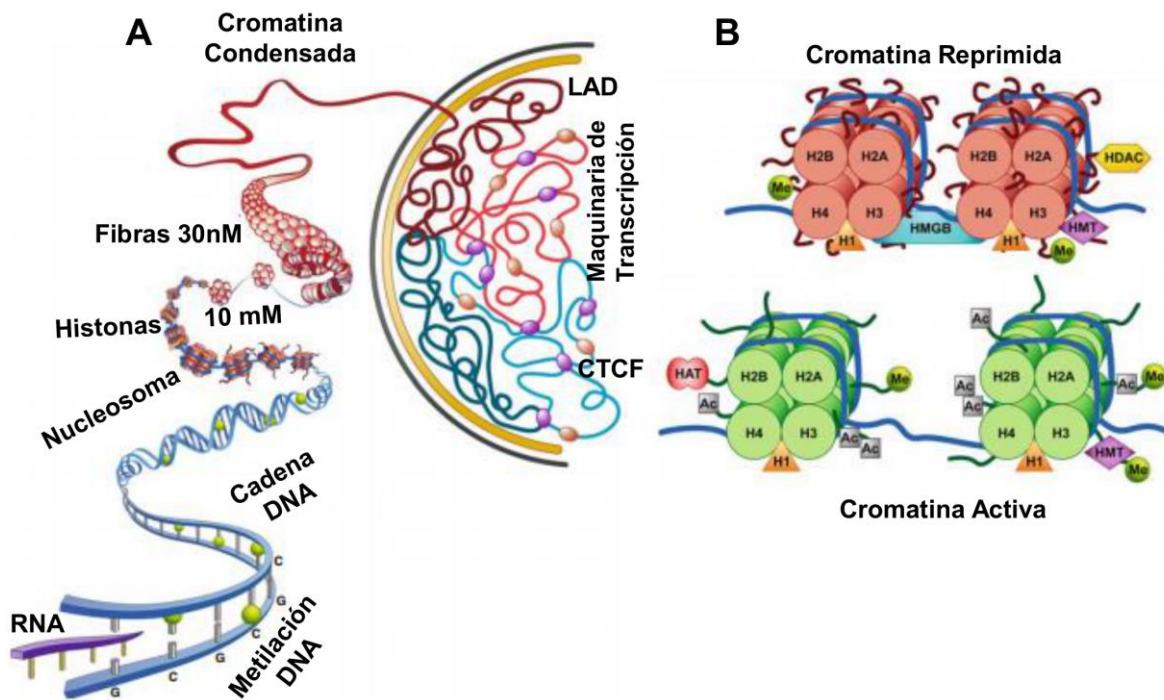


Figura 6. Estructura de la cromatina. (A) El genoma eucariota está altamente compartimentalizado, con segmentos (o regiones) funcionalmente distintas. Una gran fracción del genoma, es conocida como *dominios asociados a la Lamina* o LAD's, este segmento está asociado a la membrana nuclear y correlaciona con niveles bajos de expresión génica, indicando que LAD's representa un ambiente represivo de la cromatina. Los límites están señalados por la proteína insulador CTCF. Los bucles de la cromatina separan las regiones activas (azul claro o rojo) de las represivas (azul oscuro o rojo) y LAD's de la eucromatina. Las fibras de cromatina de 10 nm consisten en arreglos regularmente espaciados de complejos histonas – DNA, estos constituyen la estructura primaria de la cromatina. La cromatina está constituida por subunidades llamadas nucleosomas. (B) Estructura del nucleosoma. Un nucleosoma consiste en un octámero formado por proteínas histonas (dos copias de cada una: H2A, H2B, H3 y H4) envuelto por DNA. La histona H1 se une al DNA estabilizando el nucleosoma y facilitando la formación de las fibras de 30 nm de la cromatina. Las histonas que forman al nucleosoma pueden ser post-traduccionalesmente modificadas, con acetilaciones, metilaciones, etc. Estas modificaciones post-traduccionales contribuyen a la formación del estado represivo o activo en regiones de la cromatina. Las proteínas no histonas, HMGB (High-mobility group box) juegan un papel crucial en el mantenimiento de la estructura de la cromatina. Figura tomada de Adomas & Wade, 2013.

1.2.1 Nucleosomas

La “estructura canónica” de los nucleosomas incluye un segmento de DNA de 147 pb y dos copias de cada una de las cuatro proteínas conocidas como histonas canónicas (sin modificaciones post-traduccionales): H2A, H2B, H3 y H4

(Luger et al., 2012). Estas cuatro histonas son relativamente pequeñas (11 – 15 kDa), altamente básicas (punto Isoeléctrico de 10 - 11) y se encuentran conservadas en los distintos organismos eucariontes (Thatcher & Gorovsky, 1994). Para la formación del nucleosoma, las histonas primero forman heterodímeros. H3 se une con H4, formando un dímero H3/H4 con una estabilidad media, alrededor de 6-7 Kcal/mol dentro de condiciones fisiológicas (100mM NaCl, 10mM Tris HCl, pH 8), comparado con el dímero H2A/H2B que tiene mayor estabilidad, 11-12 Kcal/mol (Cutter & Hayes, 2015). Todo esto, en suma a los grupos fosfatos que contiene el DNA que se asocian a aminoácidos con carga positiva de las histonas, da lugar al nucleosoma como una estructura estable (Fig. 6B) (Luger et al., 1997; Sheinin et al., 2013).

Además de las histonas canónicas, existen las histonas no-canónicas o variantes. A diferencia de las histonas canónicas, que su función principal es el empaquetar el genoma y la regulación de genes, las variantes de histonas o histonas no-canónicas tienen una variedad de funciones en diversos procesos tales como, reparación del DNA, recombinación meiótica, segregación de los cromosomas, iniciación y terminación de la transcripción, entre otras (Allshire & Karpen, 2008; Altaf et al., 2009; Orsi et al., 2009). Esta diversidad de funciones, en parte, se debe a las diferencias estructurales entre las histonas canónicas y sus variantes, que alteran la estructura “canónica” del nucleosoma y con ello, su dinámica (nucleosoma reprimido o activo) (Talbert & Henikoff, 2010). Por ejemplo, las variantes H2A.Z y H3.3 están principalmente asociadas a conformación de la cromatina relajada y activa (con actividad transcripcional alta), mientras que la

adición de la variante macroH2A estabiliza el nucleosoma y esto se asocia a un estado reprimido de la cromatina (Biterge & Schneider, 2014).

Aunque la mayor parte de las histonas (75%) forma la estructura basal del nucleosoma, hay regiones de estas proteínas (principalmente el extremo N-terminal) que se extienden hacia el exterior del nucleosoma (Peppenella et al., 2014). Los aminoácidos en estos extremos quedan expuestos a diferentes modificaciones post-traduccionales, que ahora se sabe, son de gran relevancia biológica (Tessarz & Kouzarides, 2014)(Fig. 6B).

1.2.2 Modificaciones Post-traduccionales de Histonas

Se han identificado más de 60 residuos diferentes en histonas con alguna modificación post-traducciona (Post-Translational Modification; PTM), esto se ha logrado por medio de ensayos con anticuerpos específicos o por análisis de espectrometría de masas (Kouzarides, 2007). Las PTM en histonas son diversas; acetilación en lisina (K); metilación en lisina (K) y arginina (R); fosforilación en serina (S), treonina (T) y tirosina (Y); SUMOilación, ubiquitinación, ribosilación, entre otras (Bannister & Kouzarides, 2011). Estas modificaciones son reversibles, y varias PTM pueden actuar en combinación para contribuir a que la cromatina adquiera un estado de actividad específico (MacAlpine & Almouzni, 2013). Las PTM más estudiadas son las que se encuentran en el extremo N-terminal de las histonas (Figura 6 y Tabla 1). Algunas de estas modificaciones pueden afectar directamente las interacciones entre nucleosomas. Por ejemplo, en *Drosophila* la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac) mostró una reducción en la compactación de la cromatina, además de un incremento en la transcripción tanto *in vitro* como *in*

vivo (Akhtar et al., 2000). Además, la di- y tri-metilación de la lisina 20 de la histona H4 potencia la condensación de la cromatina *in vitro* (Lu et al., 2008). En adición a este efecto directo, las modificaciones posttraduccionales de histonas también actúan de forma indirecta, reclutando a proteínas efectoras; para bloquear o facilitar el acceso a complejos remodeladores o modificadores de la cromatina o factores de transcripción (Lawrence et al., 2016). Por ejemplo, la modificación H3K9me3 es reconocida por el cromodominio de la proteína de la heterocromatina (HP1), esta proteína se asocia a la DNA citosina metiltransferasa (DIM-2), y esta a su vez metila el DNA en esa región, esto tiene como consecuencia la represión de la transcripción en *Neurospora crassa* (Du et al., 2015). Además del extremo N-terminal, otras regiones de las histonas también son modificadas. El dominio globular central de las histonas también puede contener diversas modificaciones (ver Tabla 2 de Lawrence et al., 2016).

TABLA 1. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS

Histona	Modificación	Función	Referencia
H2A	H2AS1P	Mitosis; Ensamble de la cromatina	(Barber et al., 2004)
	H2AK4/5ac	Activación Transcripcional	(FUSAUCHI, Y., & Koichi, 1984)
	H2AK7ac	Activación Transcripcional	(Suka et al., 2001)
	H2AK119P	Espermatogenesis	(Baarends et al., 2007)
	H2AK119uq	Represión Transcripcional	(H. Wang et al., 2004)
H2B	H2BS14P	Apoptosis	(Cheung et al., 2003)
	H2BK5ac	Activación Transcripcional	(Golebiowski & Kasprzak, 2005)
	H2BK11/12ac	Activación Transcripcional	(Suka et al., 2001)
	H2BK15/16ac	Activación Transcripcional	(Suka et al., 2001)
	H2BK20ac	Activación Transcripcional	(Golebiowski & Kasprzak, 2005)
	H2BK120uq	Espermatogenesis/Meiosis	(Baarends et al., 2007)
	H2BK123uq	Activación Transcripcional	(Robzyk, Recht, & Osley, 2000)
H3	H3K4me2	Euromatina	(Santos-Rosa et al., 2002)
	H3K4me3	Elongación Transcripcional; Euromatina Activa	(K. Zhang et al., 2002) (Santos-Rosa et al., 2002)(Roguev et al., 2002)(Strahl, Ohba, Cook, & Allis, 1999)

	H3K9me3	Represion Transcripcional; Metilacion del DNA	(K. Zhang et al., 2002)(Rea et al., 2000)
	H3R17me	Activacion Transcripcional	(Bauer, Daujat, Nielsen, Nightingale, & Kouzarides, 2002; Chen et al., 1999)
	H3K27me3	Silenciamiento Transcripcional	(K. Zhang et al., 2002)
	H3K36me3	Elongacion Transcripcional	(K. Zhang et al., 2002)
	H3K4ac	Activacion Transcripcional	(Strahl et al., 1999)
	H3K9ac	Activacion Transcripcional; Depositar Histonas	(Suka et al., 2001)
	H3K14ac	Activacion Transcripcional; Reparacion del DNA	(K. Zhang et al., 2002)
	H3K18ac	Activacion Transcripcional; Reparacion del DNA; Replicacion del DNA	(K. Zhang et al., 2002)
	H3K23ac	Activacion Transcripcional; Reparacion del DNA	(K. Zhang et al., 2002)
	H3K27ac	Activacion Transcripcional	(Lawrence et al., 2016)
	H3T3P	Mitosis	(Lawrence et al., 2016)
	H3S10P	Mitosis; Meiosis; Activacion Transcripcional	(Rea et al., 2000)
	H3T11/S28P	Mitosis	(Lawrence et al., 2016)
H4	H4R3me	Activacion Transcripcional	(H. Wang et al., 2001)
	H4K20me1	Silenciamiento Transcripcional	(Nishioka et al., 2002)
	H4K20me3	Heterocromatina	(Lawrence et al., 2016)
	H4K5ac	Activacion Transcripcional; Depositar Histonas; Replicacion del DNA	(Suka et al., 2001)(K. Zhang et al., 2002)
	H4K8ac	Activacion Transcripcional; Reparacion del DNA; Elongacion Transcripcional	(Suka et al., 2001)(K. Zhang et al., 2002)
	H4K12ac	Silenciamiento Telomerico; Depositar Histonas; Activacion Transcripcional; Reparacion del DNA	(Suka et al., 2001)(K. Zhang et al., 2002)
	H4K16ac	Activacion Transcripcional; Reparacion del DNA	(Akhtar et al., 2000; Suka et al., 2001; K. Zhang et al., 2002)
	H4S1P	Mitosis	(Barber et al., 2004)

1.2.3 Metilación del DNA

En plantas, RNAs pequeños (sRNAs) de una longitud de 21 – 24 nt dirigen la maquinaria de silenciamiento de RNA de manera secuencia-específica (Hamilton et al., 2002; Xie & Yu, 2015). Los sRNAs de 21/22 nt están involucrados en el Silenciamiento Génico Post-Traduccional (PTGS) (Hamilton & Baulcombe, 1999). Los sRNAs de 24 nt están asociados con la metilación de DNA dirigida por RNA

(RdDM) (Qi et al., 2006). Sin embargo, recientes estudios indican que tanto sRNAs de 21 nt como de 24 nt están involucrados en la metilación del DNA, y proponen que los sRNAs de 21 nt pueden establecer la metilación del DNA, mientras que los sRNAs de 24 nt están involucrados en la amplificación y mantenimiento de la metilación, este mecanismo es conocido como ruta No-Canónica de metilación del DNA (Kim & Zilberman, 2014; Bond & Baulcombe, 2015).

El proceso de RdDM inicia con la biogénesis de siRNAs de 24 nt del loci blanco (regiones de DNA que serán metiladas). En este proceso, la RNA Polimerasa IV dirigida por DNA (Pol IV), enzima específica de plantas, produce RNAs de cadena sencilla (ssRNAs) del locus blanco, los cuales serán convertidos en RNAs de doble cadena (dsRNAs) por la RNA Polimerasa 2 dependiente de RNA (RDR2). Los dsRNAs son procesados por DICER-LIKE 3 (DCL3) generando RNAs pequeños (siRNA) ~24 nt. Después su producción, los siRNAs son metilados en el extremo 3' por HUA ENHANCER 1 (HEN1). Una cadena del siRNA se une a AGO4 (Argonauta 4); este complejo AGO4-siRNA ingresa al núcleo. Una vez en el núcleo el complejo AGO4-siRNA recluta a DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase_2) para catalizar la metilación *de novo* de DNA, seleccionando como blanco los transcritos nacientes sintetizados por la RNA Polimerasa V dirigida por DNA. Además de las proteínas mencionadas, para que el mecanismo de RdDM se lleve a cabo, se requieren proteínas accesorios (Matzke & Moshier, 2014; Xie & Yu, 2015)(Fig. 7).

La metilación del DNA tiene dos roles importantes: la regulación de la expresión de genes (Jones, 2012) y el silenciamiento de elementos repetidos tales como transposones, retrotransposones, regiones pericentroméricas y telómeros

(Sigman & Slotkin, 2016; Wang et al., 2016). La metilación de regiones promotoras generalmente inhibe la expresión de genes, mientras que la metilación en el cuerpo del gen no modifica su expresión (Zilberman et al., 2007; Jones, 2012). La metilación del DNA es establecida por la metilación *de novo*, y mantenida por la metilación de “*mantenimiento*” (ésta preserva la metilación ya existente) (Matzke & Mosher, 2014; Wu et al., 2010). La metilación del DNA puede ocurrir en los tres contextos; simétrico CG y CHG (H = A, T o C) y asimétrico CHH. La metilación *de novo* es catalizada por la enzima DRM2, y es mantenida por diversas enzimas; la metilación CG es mantenida por la DNA metiltransferasa 1 (MET1, también conocida como DMT1), la metilación CHG es mantenida por la Cromometiltransferasa 3 (CMT3), y la metilación CHH es mantenida por la DRM2 y el mecanismo de RdDM (Law & Jacobsen, 2010).

Existe evidencia que indica la estrecha relación que hay entre la metilación del DNA y el posicionamiento de nucleosomas (Chodavarapu et al., 2010). Por ejemplo, se ha observado que las DNA citosina 5-metiltransferasas tienen como blanco preferente el DNA que está formando parte del nucleosoma, esto sugiere que la posición del nucleosoma puede controlar la metilación del DNA (Chodavarapu et al., 2010; Feng et al., 2010). La metilación del DNA, las diversas modificaciones post-traduccionales de histonas, el posicionamiento de nucleosomas, entre otros factores epigenéticos, se encuentran regulando mecanismos como la transcripción, reparación del DNA y el silenciamiento de elementos repetidos, en diferentes regiones de la cromatina (eucromatina y heterocromatina).

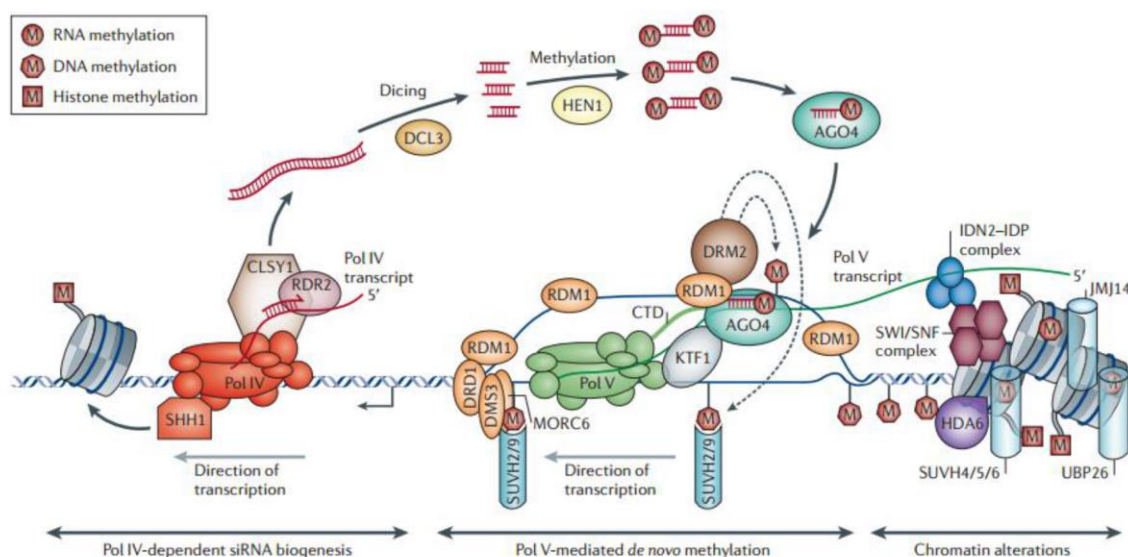


Figura 7. Esquema de la Ruta “Canónica” de Metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM).

Biogénesis de siRNAs dependientes de la RNA Polimerasa IV (Pol IV) (panel izquierdo). La Pol IV transcribe un RNA de cadena sencilla (ssRNA) que es copiado en RNA de cadena doble (dsRNA) por la RNA Polimerasa 2 dependiente de RNA (RDR2), con la asistencia del remodelador de la cromatina CLASSY1 (CLSY1). El dsRNA es procesado por DICER-Like 3 (DCL3) en siRNAs de 24 nucleótidos, que son metilados en su extremo 3' por HUA ENHANCER 1 (HEN1) e incorporados a ARGONAUTA 4 (AGO4). La RNA Polimerasa V (Pol V) media la metilación *de novo* (panel del medio). La Pol V transcribe una región que alinea con los siRNAs unidos a AGO4. AGO 4 es reclutada por medio de interacciones con el dominio carboxilo terminal de la subunidad grande de Pol V y con el factor de transcripción con dominio KOW 1 (KTF1). La RDM1 (RNA-Directed DNA Methylation 1) se une a AGO4 junto con DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase 2) y catalizan la metilación de DNA *de novo*. La transcripción por Pol V puede ser facilitada por el remodelador de la cromatina DRD1 (Defective in RNA-directed DNA Methylation 1) junto con RDM1, DMS3 (Defective in Meristem Silencing 3) y MORC6 (Microrchidia 6) por relajación de esa región de la cromatina. El posicionamiento de nucleosomas (panel derecho) es equilibrado por el complejo SWI/SNF, el cual interactúa con el complejo IDN2 (Involved in *de novo* 2) – IDP (IND2 parálogo) que se une al transcrito nascente de RNA (sintetizado por Pol V). La adición de modificaciones post-traduccionales represivas en histonas (tal como H3K9me por SUVH4, SUVH5 y SUVH6) se facilita por HDA6 (Histone desacetilase 6), JMJ14 (Jumonji 14) y UBP26 (Ubiquitin-Specific Protease 26) ya que estas remueven las marcas post-traduccionales de histonas relacionadas a activación. Figura tomada de Matzke & Mosher, 2014.

1.3 Interacción Geminivirus – Planta

Para que la infección de cualquier virus sea exitosa, éste debe ser capaz de inducir en el hospedero cambios metabólicos, fisiológicos y de expresión génica ya sea de manera temporal y/o espacial (Golem & Culver, 2003; Whitham et al., 2003). Las consecuencias macroscópicas de todas estas interacciones y cambios en la expresión génica provocados por los virus en el hospedero son conocidos como síntomas. En el caso de los begomovirus, los síntomas pueden ir desde ligeras clorosis de venas o mosaicos hasta la deformación foliar, abscisión floral y enanismo de la planta (Carrillo-Tripp et al., 2007).

Para identificar y tratar de entender todos estos cambios, se han realizado análisis masivos de la expresión de genes, utilizando técnicas como microarreglos y RNAseq (Golem & Culver, 2003; Góngora-Castillo et al., 2012; Mochizuki et al., 2014). Estos análisis han permitido determinar cambios coordinados en la expresión de genes en respuesta a la infección de diversos virus de RNA, así como alteraciones específicas en respuesta de cada uno (Whitham et al., 2003). Sin embargo, los cambios en los patrones de expresión de genes en plantas infectadas por virus de DNA han sido menos estudiados. Ascencio-Ibañez y colaboradores (2008), realizaron el análisis del transcriptoma de *Arabidopsis* en respuesta a la infección con el geminivirus, Cabbage leaf curl virus (CaLCuV), encontrando 5365 genes diferenciales. Entre los genes inducidos encontraron algunos relacionados con la ruta de ácido salicílico, apoptosis, estrés genotóxico y reparación del DNA. Además, encontraron que, genes relacionados al ciclo celular estaban siendo alterados por la infección (Ascencio-Ibañez et al., 2008).

Algunos de estos estudios de interacción proteínas geminivirales-hospedero, muestran que al expresar individualmente proteínas de los virus de MYMV (*Mungbean yellow mosaic virus; virus del mosaico amarillo del garbanzo verde*) y TLCV (*Tomato leaf curl virus; virus del enrollamiento de la hoja del tomate*), que todas las proteínas virales (excepto CP) interactúan con proteínas del hospedero y algunas de ellas producen un fenotipo similar al de los síntomas provocados por la infección viral (Selth et al., 2004).

Los geminivirus no codifican para una DNA polimerasa, sin embargo, tienen la capacidad de infectar y replicarse en tejido diferenciado, en donde la maquinaria de replicación ya no es activa. Esto sugiere que los geminivirus inducen la expresión de factores necesarios para iniciar su ciclo infectivo (Nagar et al., 1995; Lucy et al., 1996). Existen varios estudios donde se aporta evidencia de la inducción de factores celulares por geminivirus. Por ejemplo, en plantas de tabaco, se demostró que la expresión del antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA) en tejido sano y diferenciado es nula, pero ésta se induce en el tejido diferenciado infectado con el virus TGMV (*Tomato golden mosaic virus; Virus del mosaico dorado del tomate*), la inducción de PCNA es debida específicamente a la presencia de la proteína viral Rep (Nagar et al., 1995; Egelkrout et al., 2001).

1.3.1 Remisión de síntomas (Recuperación).

Un fenómeno que se ha observado en algunas interacciones begomovirus-planta que resulta muy interesante, es el de remisión de síntomas o recuperación, este se caracteriza por la disminución de síntomas en las hojas

posteriores a la infección. Este fenómeno fue observado en la interacción de plantas de *Vigna mungo* con *Vigna mungo yellow mosaic virus* (VMYMV). Las plantas de *V. mungo* que sobre-expresaban dsRNA de secuencia similar a la región intergénica de VMYMV, fueron infectadas por VMYMV y observaron que las plantas inoculadas se recuperaban de la infección. Los dsRNA inducían los mecanismos de silenciamiento génico (TGS y PTGS) (Pooggin et al., 2003). La recuperación también se observó en la interacción de *African cassava mosaic virus* (ACMV) con plantas de *Nicotiana tabacum* y *Manihot esculenta* (cassava). En este estudio relacionaron la severidad de los síntomas y la recuperación, con la acumulación de siRNAs de secuencia similar al genoma viral, de un tamaño entre 21 – 26 nucleótidos (Chellappan et al., 2004). Otro sistema en donde se ha observado la recuperación, es en plantas de *Arabidopsis* y *Beet curly top virus* (BCTV L2-), virus mutante deficiente en TrAP (en este trabajo se denominó como L2). El DNA viral aislado de plantas recuperadas se encontró hipermetilado a diferencia del virus obtenido de plantas infectadas con BCTV silvestre donde no hay recuperación. Además, líneas mutantes de *Arabidopsis* en genes relacionados a rutas de metilación fueron hipersensibles a la infección con BCTV L2-(Raja et al., 2008). Este es el primer trabajo donde dan evidencia de que modificaciones post-traduccionales de histonas (H3ac, H3K4me2, H3K9me2 y H3K27me2) estas asociadas al genoma viral (Raja et al., 2008). En el sistema natural *Capsicum annum* – PepGMV se observó este mismo fenómeno (Carrillo-Tripp et al., 2007). Plantas de Chile inoculadas por bombardeo a baja presión en la 3ra o 4ta hoja verdadera (h.v.), después de 10 a 15 días post-inoculación (dpi), las hojas 5ta a 8va mostraron los síntomas característicos de la infección por PepGMV (mosaicos dorados y

arrugamiento de las hojas). Las hojas siguientes (> 9na) mostraron una reducción significativa en la intensidad de los síntomas, y en algunos casos los síntomas desaparecieron por completo (Fig. 8). En este estudio se relacionó la disminución o pérdida de síntomas, con el decremento en la concentración de DNA y RNA viral (Carrillo-Tripp et al., 2007). Además probaron que existe resistencia específica en plantas en remisión, e identificaron RNAs pequeños similares a la secuencia de los dos componentes genómicos del virus, sugiriendo que el PTGS es parte del mecanismo de defensa que conduce a la remisión de síntomas (Carrillo-Tripp et al., 2007). Posteriormente, Rodríguez-Negrete et al., (2009) realizaron el análisis de RNAs pequeños provenientes del genoma viral, y encontraron RNAs de un tamaño de 24 nt que resultaron complementarios a las regiones intergénicas del genoma viral, que correlacionaban con los niveles de metilación en la esta misma región, que se incrementaban alrededor del 15% en hojas en remisión.



Figura 8. Planta de Chile infectada con PepGMV mostrando remisión de síntomas. Planta de Chile infectada con PepGMV, después de 18 días pos-inoculación. **BI**, hoja debajo de la hoja inoculada; **S**, hojas con síntomas; **R**, hojas en remisión (Figura de Carrillo-Tripp *et al.*, 2007).

Varios estudios sugieren la posible función de la metilación del DNA viral, como una estrategia de defensa de la planta contra geminivirus. Por ejemplo, la metilación *in vitro* de DNA geminiviral reduce drásticamente su infectividad (Brough *et al.*, 1992; Ermak *et al.*, 1993). Carrillo-Tripp *et al.* (2007), aislaron DNA viral total (PepGMV) de hojas de plantas de Chile con síntomas (10 dpi) y remisión (24 dpi). La inoculación de plantas sanas con este DNA provocó los síntomas característicos a una infección por PepGMV (Carrillo-Tripp J. 2007. Cinvestav Irapuato, Tesis Doctoral). Por lo tanto, el DNA viral proveniente de tejido sintomático o en remisión, resultaron igualmente capaces para producir la infección, aunque cabe señalar que dentro del DNA viral total usado, para la inoculación, se encontraba DNA de cadena doble (dsDNA) y sencilla (ssDNA), que como se sabe, tienen características biológicas diferentes (ver los apartados de Replicación y Transcripción viral). Existe controversia sobre el tipo de DNA viral que está siendo metilado y su posible relevancia biológica (Paprotka *et al.*, 2015; Pooggin, 2013). Hasta el momento, no existen datos contundentes que muestren si el ssDNA puede o no estar metilado. Por otra parte, se sabe que el dsDNA asociado a histonas sí se encuentra metilado (Raja *et al.*, 2013). El DNA viral asociado a histonas con modificaciones post-traduccionales relacionadas a activación (H3Ac) se encontró hipometilado (aprox. 40%), mientras que el DNA viral asociado a modificaciones de represión (H3K9me2) se encontró hipermetilado (aprox. 95%) (Raja *et al.*, 2013). Recientemente, se han vinculado directamente la H3K9me como una marca esencial para el mantenimiento del TGS contra geminivirus, en *Nicotiana*

benthamiana (Sun et al., 2015). Además, la proteína viral TrAP interactúa directamente con la histona metiltransferasa SuvH4 (KYP) para inhibir su función (Castillo-González et al., 2015).

En resumen, el fenómeno de remisión de síntomas o recuperación, se caracteriza por una drástica disminución en la concentración de DNA y RNA viral, que puede deberse a la acción combinada de los mecanismos de silenciamiento génico post-transcripcional y transcripcional. Si consideramos que el minicromosoma viral, es una molécula clave en la regulación de la transcripción y replicación viral, entonces es posible que exista una afectación directa sobre él, que nos ayude a elucidar este fenómeno.

II. Hipótesis

En el fenómeno de remisión de síntomas observado en el modelo PepGMV-*Capsicum annuum*, el minicromosoma viral está siendo afectado directamente por marcas epigenéticas. Por lo tanto, se podrán distinguir distintas poblaciones de minicromosomas al analizar diferentes estadios del ciclo infectivo de PepGMV.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Analizar la estructura del minicromosoma viral de PepGMV en diferentes estadios del proceso infectivo en *Capsicum annuum*.

3.2 Objetivos particulares

- Diseñar un protocolo para la purificación del minicromosoma viral.
- Comparar la conformación del minicromosoma viral obtenido de tejido sintomático y en remisión.
- Analizar el perfil de metilación del minicromosoma viral en ambos estadios.
- Analizar si existen diferencias en las modificaciones post-traduccionales de las histonas asociadas a las diferentes poblaciones de minicromosomas,
- Identificar proteínas asociadas al minicromosoma.

IV. Materiales y Métodos

4.1 Inoculación de plantas de chile.

Se germinaron semillas de chile (*Capsicum annuum* L. var. Sonora Anaheim) en una cámara bioclimática a 28°C con un fotoperiodo de 16:8h (luz/oscuridad). Las plantas se inocularon por bombardeo usando la clona dimérica infectiva del *virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV) (Carrillo-Tripp et al., 2007). Las muestras de tejido sintomático fueron colectadas a 10 días después de la inoculación (dpi) y las muestras de tejido en remisión fueron colectadas a los 24 dpi. Las muestras fueron congeladas usando nitrógeno líquido, y almacenadas a -80°C.

4.2 Digestión con nucleasa micrococcal e hibridación tipo Southern.

Se maceraron 5g de tejido fresco con la ayuda de mortero y N₂ líquido, hasta obtener un polvo fino. El tejido fue resuspendido en 20 ml de buffer 10mM Tris-HCl pH 8, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.15 mM espermina, 0.5 mM espermidina y 0.5% Tritón X-100. Esta solución se pasó a través de tres mallas de gasa, y tres mallas Miracloth. El filtrado fue centrifugado a 1000g por 10 min a 4°C. El sedimento que contiene los núcleos, se lavó con 5 ml de buffer de digestión (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.15 mM espermina y 0.5 mM espermidina) usando las mismas condiciones de centrifugación mencionadas antes. Los núcleos fueron resuspendidos en 1 ml de buffer de digestión conteniendo 10 mM CaCl₂. Se transfirieron 100 µl de los núcleos en seis tubos de 1.6 ml. A cada uno de los tubos se le agrego una concentración específica de nucleasa micrococcal (ThermoScientific #EN0181), que va desde 0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 Unidades, además

de 1 μ l de RNAsa. La muestra se incubo por 10 min a 37°C. Para detener la reacción se agregaron 80 μ l de buffer de digestión y 20 μ l de buffer stop (100mM EDTA, 10mM EGTA). Para la extracción de DNA, se agregaron 3 μ l de proteinasa K (25 mg/ml) y 10 μ l de SDS (20%). La muestra se incubo toda la noche a 37°C. Después de la incubación se agregó 200 μ l de fenol:cloroformo (1:1) y se agitó vigorosamente: Después de centrifugar a 12 000g por 10 min a 4°C, se colecto la solución acuosa y se le agregó 1 μ l de glicógeno (5mg/ml) y 500 μ l de etanol absoluto (- 20°C). Se dejó incubando a - 70°C por 1h. El DNA fue colectado por centrifugación a 12 000g por 15 min a 4°C. El DNA fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (60 V/ 3 h) y transferido a una membrana (tipo de membrana).La membrana fue pre-hibridada por 2 h a 65°C con buffer de hibridación (7 % SDS, 1 % BSA, 1 mM EDTA pH 8.0, 250 mM NaPO₄ pH 7.2). Transcurrido el tiempo se cambió el buffer por buffer fresco y se agregó la sonda marcada con biotina (el componente A de PepGMV fue usado como sonda, y se utilizó el Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (ThermoScientific #K0651) para hacer el marcaje). La sonda se incubo a 65°C toda la noche. La detección se realizó con Biotin Chromogenic Detection Kit (ThermoScientific #K0661). La imagen fue analizada con la ayuda del programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

4.3 Purificación del minicromosoma de PepGMV.

Se maceró 20 g del tejido fresco con ayuda de mortero y N₂ líquido, hasta obtener un polvo fino. El tejido pulverizado se transfirió a un vaso de precipitado con 200 ml de buffer A (10 mM Tris-HCl pH 9, 80 mM KCl, 1 mM espermidina, 1 mM espermina, 0.5 % Tritón X-100, 500 mM Sacarosa ultra pura y 15 mM β -

mercaptoetanol), suplementado con una tableta de inhibidores de proteasas (SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet, #S8830). El homogeneizado se filtró usando cuatro capas de gasa. El filtrado resultante se filtró nuevamente pero usando tres capas de malla Miracloth (Calbiochem #475855). Tras centrifugar por 15 min a 2000 g (Sorvall super T21, SL250T), el sedimento rico en núcleos se resuspendió en 1 ml de buffer B (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 % Tritón X-100) con ayuda de un pincel, y se centrifugó por 5 min a 2000 g (sorvall super T21, SL50T). El sedimento rico en nucleos se resuspendió con ayuda de un pincel en 1 ml de buffer de extracción (10mM Tris-HCl pH 8, 0.05% Sarkosyl, 1% Tritón X-100) y se incubó por 15 min en hielo. La suspensión se centrifugó por 15 min a 2000g. El sobrenadante obtenido contiene el minicromosoma viral.

4.4 Ensayos de inmunoprecipitación de la Cromatina.

El protocolo usado para la inmunoprecipitación de la cromatina se basó en la metodología descrita por Saleh y colaboradores (Saleh et al., 2008). Se tomó 1 g de tejido sintomático y en remisión para purificar el minicromosoma viral (500 μ l). Las perlas recubiertas con proteína A (Millipore; 16-157) se lavaron por 2 h a 4°C. La inmunoprecipitación se realizó toda la noche a 4°C, usando 3 μ g de cada anticuerpo, Anti-Histona H2B (Millipore; 07-371) y Anti-Histona H3 (Millipore; 06-755). El DNA inmunoprecipitado se extrajo usando fenol/cloroformo, seguido por precipitación con etanol absoluto. El DNA purificado se cuantificó por PCR tiempo real, usando oligos específicos para PepGMV.

Para realizar el análisis de las fracciones del gradiente de sacarosa, fue necesario eliminar la sacarosa, y concentrar la muestra (10X). Para ello se utilizó un centricon (10,000 NMWL; Amicon Ultra-4), obteniendo un volumen final de 50 μ l. Se utilizaron 10 μ l de cada fracción (10X) para cada inmunoprecipitación. Las perlas recubiertas con proteína A (Millipore; 16-157) se lavaron por 2 h a 4°C. La inmunoprecipitación se realizó toda la noche a 4°C, usando 3 μ g de cada anticuerpo, anti-Histona H3K9me2 (Millipore; 17-658) y anti-Histona H3K4me3 (Millipore; 17-648). El DNA inmunoprecipitado se extrajo usando fenol/cloroformo, seguido por precipitación con etanol absoluto. El DNA purificado se cuantificó por PCR tiempo real, usando oligonucleótidos específicos para PepGMV.

4.5 Sedimentación del minicromosoma viral por medio de gradientes discontinuos de sacarosa.

El sobrenadante de la extracción con Sarkosyl que contiene el minicromosoma viral (1 ml) se separó usando un gradiente discontinuo de sacarosa (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1X coctel de inhibidores de proteasas y, 15 %, 25 %, 35 % W/V sacarosa). Las muestras se centrifugaron a 250, 000g por 1 h a 4°C (Sorvall, SW55Ti). Las fracciones se lavaron dos veces usando 5 ml de buffer tris -HCl pH 8, y se concentraron 10 veces. Tanto el lavado como la concentración de la muestra se realizaron con ayuda del centricon (10,000NMWL; Amicon Ultra-4) a 4000g por 15 min a 4°C (IEC Milti Thermo Electron Corporation, rotor 8947, adaptador 6563E). Se tomó una alícuota de 20 μ l de cada fracción, y se incubó con 2 % SDS, 25 mM EDTA, 3 μ l proteasa K (20 mg/ml), a 37°C toda la noche. El DNA se purificó usando

el método estándar de fenol/cloroformo, y se precipitó con etanol absoluto (1h / -70°C)

4.6 Cuantificación del DNA viral por PCR tiempo real.

El PCR se realizó en un termociclador StepOne System (Applied biosystems) usando SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma #S4438). Para reacciones de 20 μ l, se utilizó 2 μ l de DNA, 1 μ l de cada oligonucleótido (10 μ M). La amplificación y cuantificación se hicieron utilizando el siguiente programa: 95°C por 15 s. 57°C por 1 min, con mediciones de fluorescencia simples, por 40 ciclos. El programa usado para la curva de disociación fue de 60 a 90 °C con un aumento de temperatura de 0.1°C por segundo y con mediciones continuas de fluorescencia. Los oligos usados fueron PepGMVRepq5' (5'-CAAAGCTGGTGATCCGAAAAACG-3') y PepGMVRepq3' (GTAAACGAGGATAATGGATAAGG-3'), que dan un fragmento esperado de 120 pb. Para crear la curva estándar para la cuantificación absoluta del DNA viral, se realizaron diluciones seriadas que contenían el dsDNA PepGMV (monómero) en un rango de 10^7 a 10^3 moléculas por microlitro. La curva estándar se obtiene por un análisis de regresión lineal de la cuantificación del valor de los ciclos (Cq) de cada una de las tres replicas técnicas sobre el \log_{10} de la concentración de DNA. La eficiencia (E) del qPCR es calculada con la siguiente fórmula: $E = e^{(\ln 10 / -s)} - 1$ donde s fue igual - 3.571, por lo tanto la eficiencia de los oligonucleótidos usados fue del 96.5 %. La cuantificación del DNA viral se obtuvo por extrapolación de los datos de Cq con la curva estándar.

4.7 Cuantificación absoluta de ssDNA y dsDNA viral.

La cuantificación de las moléculas de ssDNA y dsDNA se hizo usando la metodología previamente descrita para TYLCV (Rodríguez-Negrete et al., 2014). Se utilizó el monómero PepGMV A para preparar la curva estándar para la cuantificación absoluta. El etiquetado de la cadena del virión (VS) se hizo utilizando el oligonucleótido VS-TAG (5'AGTTTAAGAACCCTTCCCGCCATGACGCTGTTGGTGTGGTTCTTG-3'), mientras que para etiquetar la cadena complementaria (CS) se usó el oligonucleótido CS-TAG (5'-AGTTTAAGAACCCTTCCCGCCCCATCGTG TAGGCAAGCGTTTCTG-3'). Los oligonucleótidos usados para la cuantificación absoluta de cada cadena fueron: CS (5'-CATGACGCTGTTGGTGTGGTTCTTG-3') y VS (5'-CCCATCGTG TAGGCAA GCGTTTCTG-3'), combinados con el oligonucleótido TAG (5'-AGTTTAAGA ACCCTTCCCGC-3'). La eficiencia (E) del qPCR se calculó con la siguiente fórmula: $E = e^{(\ln 10 / -s)} - 1$. Para CS la eficiencia fue de 109%, mientras que para VS fue de 100.8%. La cuantificación del DNA viral se obtuvo por extrapolación de los datos de Cq con la curva estándar.

4.8 Análisis de metilación del DNA viral por Bisulfito.

Se trataron 100 ng del minicromosoma viral de acuerdo con las instrucciones del fabricante (EZ DNA Methylation-Gold Kit, #D5005). El DNA viral tratado con bisulfito se usó como templado para PCR usando los oligonucleótidos y condiciones previamente descritas (Rodríguez-Negrete et al., 2009). Se amplificó un fragmento de 580 pb, usando oligonucleótidos específicos para la cadena complementaria al

virión, correspondiendo 337 pb de la región intergénica (IR) de PepGMV A, los primeros 183 pb de la región codificante de CP, y los primeros 60 pb de la región codificante de Rep. Los productos de PCR se clonaron con el kit CloneJET PCR cloning (#K1231) y 12 clonas fueron secuenciadas. Los datos se analizaron usando el programa Kismeth (Gruntman et al., 2008) web site: <http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>.

4.9 Identificación de las proteínas aisladas de MCV de Síntomas y Remisión

La fracción 1 del gradiente de sacarosa de MCV de síntomas, y la fracción 6 de remisión fueron seleccionadas para el análisis de proteínas. A estas fracciones (síntomas y remisión) se les eliminó la sacarosa y se concentraron con la ayuda de un centricon Amicon Ultra 4, Millipore (10,000 MWCO). El concentrado fue digerido con la proteasa tripsina por 10h, y los péptidos obtenidos fueron separados por HPLC en el instrumento ACELLA (Thermo Fisher Scientific, Inc.) con una columna Picofrit C18. La separación se realizó con un gradiente lineal de acetonitrilo 3-70% en 0.1% de ácido fórmico (15 min; flujo de 600 nl/min). Los péptidos fueron analizados en el espectrómetro de masas LTQ Velos Ion-Trap (Thermo Fisher Scientific, Inc.), con ionización nanospray. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Trans-Proteomic Pipeline, utilizando la base de datos de proteínas de *Arabidopsis* de Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

V. Resultados

5.1 Diferencias en la estructura del minicromosoma viral proveniente de tejido en síntomas y en remisión.

Se sabe que el minicromosoma viral se encuentra sometido a diversas modificaciones epigenéticas tales como; metilación del DNA y modificaciones post-traduccionales de histonas (H3ac, H3K4me3, H3K9me2 y H3K27me) (Raja et al., 2008; Rodríguez-Negrete et al., 2009; Raja et al., 2013). Estas marcas epigenéticas pueden regular el estatus la cromatina, de activo (eucromatina) a inactivo (heterocromatina) y viceversa (Bannister & Kouzarides 2011; Li et al., 2015). Tanto el aumento en la metilación del DNA como la presencia de H3K9me2, se relaciona a la formación de la heterocromatina (Cedar & Bergman, 2009). Sin embargo, la mayoría de los trabajos se han enfocado a los cambios químicos (modificaciones) de la cromatina y poco se ha estudiado la estructura u organización de la misma. Hay varias formas de estudiar la estructura de la cromatina: EM (Electron Microscopy), ensayos por medio de electroforesis que puede diferenciar la conformación de moléculas de DNA, ensayos de sensibilidad a nucleasas, etc.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que las marcas epigenéticas encontradas en el minicromosoma viral en tejido en remisión pueden estar afectando su estructura. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis de sensibilidad a nucleasas (Nucleasa micrococal, NM) de núcleos obtenidos de los tres tipos de tejido: mock, síntomas y remisión. El análisis incluyó digestiones con diferentes concentraciones de la enzima NM, y se realizó una comparación de los patrones de bandeo provenientes del minicromosoma viral. Esta es una técnica ampliamente usada para

analizar estructura de la cromatina (Nalabothula et al., 2014; Zalckvar et al., 2013). En los datos obtenidos, se puede observar que el minicromosoma viral de tejido sintomático se digiere con mayor facilidad comparado con el minicromosoma viral de tejido en recuperado. Esto lo podemos ver claramente cuando se usa 1 unidad de enzima (1U), mientras que el MCV de síntomas ya generó mononucleosomas, el MCV de recuperado aún no se logran observar (Figura 9B). Además, cuando se utilizan 10 unidades de enzima (10U) se observa que en tejido con síntomas (S) el 16.4 % de los nucleosomas es encontrado en forma de dímero (di-) mientras que el 83.5 % está como mononucleosomas. Por otro lado, en el tejido recuperado la distribución es la siguiente: el 12.9 % está en forma trimérica, el 54.5 % lo encontramos como dinucleosomas y el 28.3 % está en forma de mononucleosoma (Fig. 9C). Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia de la ocurrencia de compactación de la estructura del minicromosoma viral en el fenómeno de remisión.

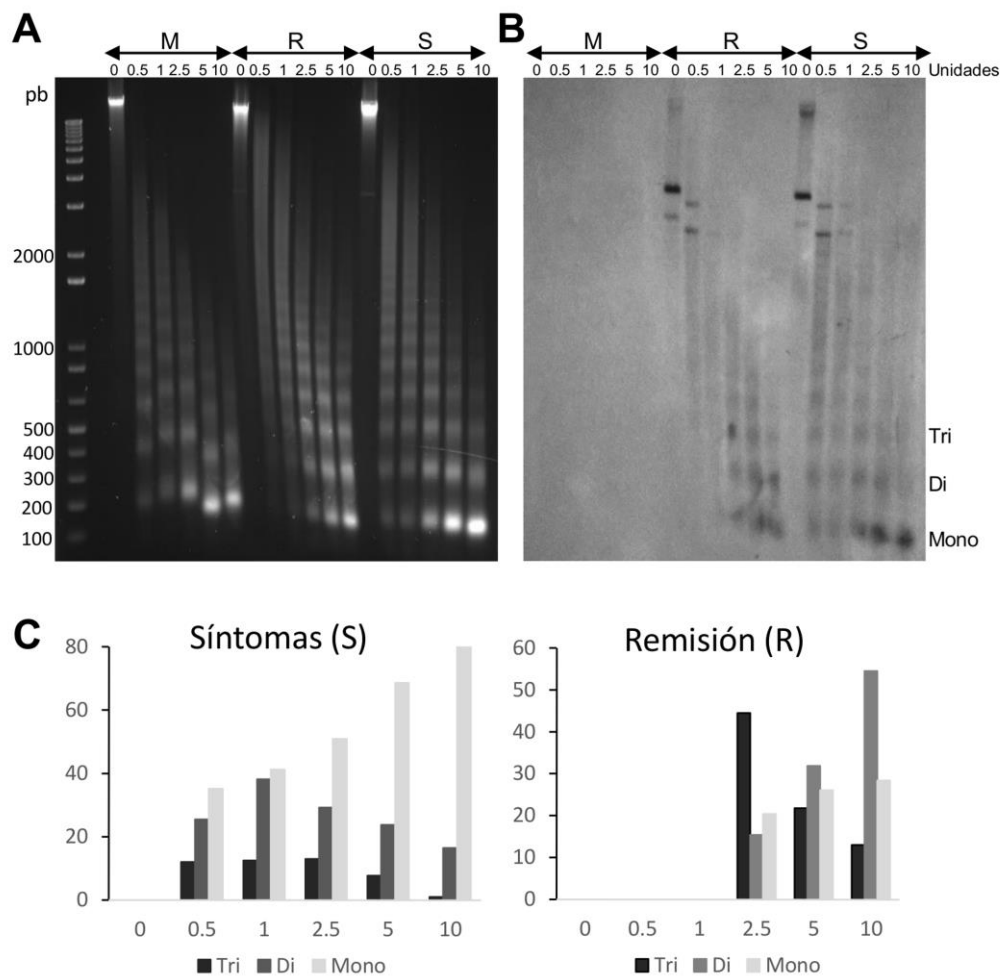


Figura 9. Ensayo de sensibilidad a la nucleasa micrococcal del minicromosoma obtenido de tejido de plantas sintomáticas y en remisión. Núcleos obtenidos de tejido de plantas mock (M), sintomáticas (S) y en remisión (R) fueron tratados con diferentes concentraciones de nucleasa micrococcal (0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 unidades) por 10 min a 37°C. Después del tratamiento, los fragmentos de DNA obtenidos se purificaron, y analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, seguido de una hibridación usando como sonda PepGMV-A. El panel **A**, muestra la migración de los fragmentos de DNA en geles de agarosa teñidos con GelRed. El panel **B**, muestra la hibridación con los fragmentos de DNA de PepGMV generados después de la digestión con la nucleasa micrococcal. El panel **C**, muestra la concentración relativa de las fracciones de mono-nucleosomas (~150 pb), di-nucleosomas (~350 pb) y tri-nucleosomas (~500 pb) observadas en el panel B.

5.2 Extracto enriquecido con minicromosoma viral

Una de las limitaciones que se encuentran al estudiar la estructura de los minicromosomas virales es la baja concentración de estas estructuras en la planta infectada. Esto es especialmente notable en virus limitados al floema, tal como lo

es nuestro modelo de estudio, PepGMV. Otra limitación importante es la asincronía de la infección. Es decir, en el tejido infectado hay células donde la infección se encuentra en estado avanzado, mientras que en otras células el virus acaba de llegar y la infección apenas inicia.

Partiendo de una fracción subcelular rica en núcleos, se diseñó una metodología para obtener extracto enriquecido de complejos proteicos asociados con cccDNA viral (minicromosoma viral). El objetivo es que este extracto contenga mínima contaminación de cromatina de la planta y de ssDNA viral, porque esto facilitará el estudio de los procesos de replicación y transcripción del virus. Para esto realizaron diferentes pruebas con diversos cationes (NaCl, espermidina, espermina $MgCl_2$), detergentes (individual o en mezclas: SDS, Tween 20, Sarkosyl y/o Tritón X-100) y diferentes pHs (desde 5 – 9). Uno de los métodos más usados para la obtención de histonas es el de sales, el NaCl solubiliza la cromatina, por lo tanto se utilizaron dos concentraciones reportadas 100 mM y 600 mM NaCl. En los núcleos tratados con 1% Tritón x-100/ 100 mM NaCl no se logró solubilizar la cromatina, mientras que con el tratamiento 1% Tritón x-100/ 600 mM NaCl, se logra observar una gran cantidad de DNA tanto viral como de la planta (Fig. 10A). El extracto correspondiente al tratamiento con 600 mM NaCl, se separó por medio de gradiente discontinuo de sacarosa para eliminar histonas libres y cromatina de la planta, la fracción conteniendo el DNA viral fue lavada, se extrajeron las proteínas y estas fueron separadas en un gel de acrilamida al 10%, pero al analizar el gel no se observó ninguna de las histonas (Fig. 10B). El NaCl a 600 mM disocia la cromatina.

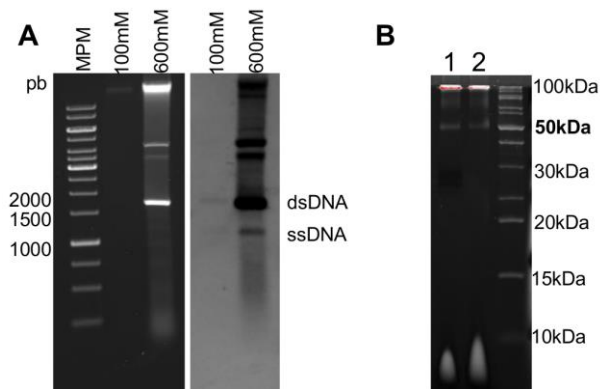


Figura 10. Extracción de MCV de núcleos obtenidos de tejido sintomático usando NaCl. La fracción rica en núcleos fue tratada con Tritón X-100 + NaCl. Los ácidos nucleicos purificados del extracto obtenido de los núcleos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. **(A)** 1 % Tritón X-100 adicionado con 100 mM y 600 mM NaCl. **(B)** Proteínas obtenidas del extracto (A) a 600 mM de NaCl, después de un gradiente de sacarosa (para eliminar proteínas libres). 1) Núcleos sintomáticos y 2) núcleos sanos como control. Gel de acrilamida al 10% teñido con SYPRO Ruby.

Los resultados anteriores muestran que es posible obtener DNA viral desnudo, es decir, sin proteínas asociadas. Por lo tanto, para obtener el minicromosoma viral íntegro era necesario buscar una combinación de cationes que estabilizaran su estructura, pero que además esta condensación no fuera tan elevada, como para impedir la salida del minicromosoma del núcleo. Las moléculas usadas comúnmente como cationes estabilizadores de la cromatina son: $MgCl_2$, espermidina y espermina. En la figura 11 se muestran las diferentes combinaciones usadas. Cuando utilizamos solo el $MgCl_2$ se observa el patrón característico de degradación de la cromatina, posiblemente porque este catión no es suficiente para estabilizar y proteger la cromatina del ataque de las nucleasas, además que estas utilizan el Mg^+ como su principal cofactor (Fig. 11A). Las diferentes concentraciones y combinaciones de espermidina/espermina/ $MgCl_2$, mostraron una mayor efectividad al proteger la cromatina (Fig.11B). La combinación de 1 mM

espermidina/ 1 mM espermina, mostro ser la más adecuada porque se pudo obtener MCV con una mínima contaminación por DNA genómico y ssDNA viral (Fig.11B, línea 1).

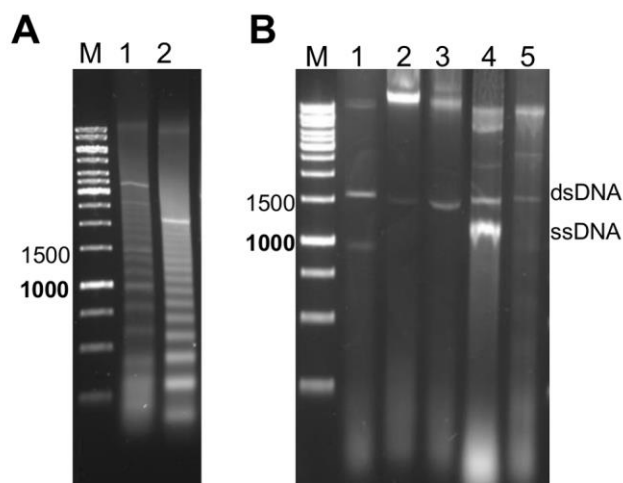


Figura 11. Extracción de MCV usando diferentes estabilizadores de cromatina. La fracción rica en núcleos fue tratada con diferentes concentraciones y combinaciones de $MgCl_2$, espermidina y espermina. Los ácidos nucleicos solubilizados de los núcleos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. **A)** Línea 1, 1mM $MgCl_2$. Línea 2, 1mM $MgCl_2$. **B)** Línea 1, 1 mM espermidina/ 1 mM espermina. Línea 2, 0.5 mM espermidina/ 0.5 mM espermina. Línea 3, 0.5 mM espermidina/ 0.5 mM espermina/ 1mM $MgCl_2$. Línea 4, 0.5 mM espermidina/ 0.15 mM espermina. Línea 5, 0.5 mM espermidina/ 0.15 mM espermina/ 1mM $MgCl_2$. M, es el marcador de tamaño molecular (pb).

El uso de detergentes tales como SDS y Sarkosyl (concentraciones $> 0.05\%$) tienden extraer el DNA viral pero sin proteínas asociadas (histonas). El tratamiento con otros detergentes tales como CHAPS, Tween 20 o Tritón X-100 no logran extraer el DNA viral de los núcleos. Además, existen reportes que muestran que cuando se utiliza un buffer a pH <7 , la cromatina tiende a condensarse, mientras que cuando se usan buffer con un pH >9 se favorece la disociación de histonas de la cromatina (Guo & Cole, 1989). Después de todas estas pruebas el protocolo óptimo para recuperar la mayor cantidad de cccDNA asociado con histonas, fue el

incubar la fracción rica en núcleos con una mezcla de Tritón X-100 (1%) y Sarkosyl (0.05%) a pH 8 (Fig. 12), y con la combinación de 1 mM espermina/1mM espermidina para estabilizar la cromatina.

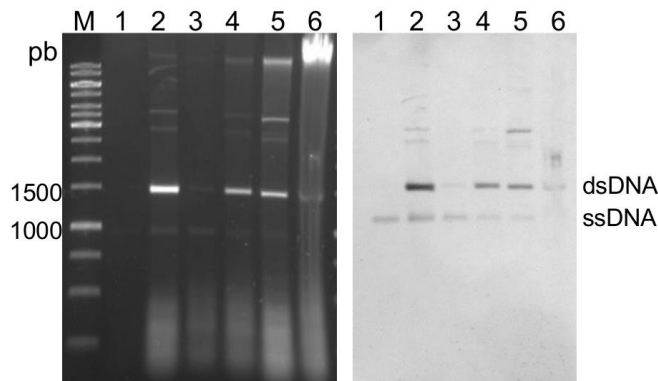


Figura 12. Extracción de MCV usando detergentes. La fracción rica en núcleos fue tratada con diferentes detergentes (1% Triton X-100 y 0.05% Sarkosyl) y el material solubilizado de los núcleos fue analizado por electroforesis en gel de agarosa. Línea1, 1% Tritón X-100. Líneas 2-5 extracciones sucesivas con 1% Tritón X-100/ 0.05% Sarkosyl. Línea 6, restos nucleares obtenidos con 1% Sarkosyl. El panel derecho muestra la hibridación de las mismas muestras usando como sonda PepGMV A. M, es el marcador de tamaño molecular (pb).

Este método de extracción inicia con 20 g de tejido pulverizado (aprox. 100 plantas). De este tejido se obtiene un extracto rico en núcleos que es tratado con 1% de Tritón x-100 (principalmente para reducir la contaminación por cloroplastos) y 0.05% Sarkosyl a pH 8.0, de este extracto se obtiene DNA viral asociado con proteínas, tales como histonas. Con la purificación de DNA (usando metodología estándar; fenol/cloroformo y precipitación con etanol absoluto) del extracto nuclear se logró obtener 10 μ g de DNA viral. El DNA viral (cccDNA y ssDNA) se observó e identifico por electroforesis en gel de agarosa (1%) e hibridación (usando DNA de PepGMV A como sonda) (Fig. 13A).

Para confirmar la identidad de las bandas para cccDNA y ssDNA, el DNA fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. Estas enzimas reconocen un sitio único en los componentes PepGMV A y PepGMV B, respectivamente (Carrillo-Tripp et al., 2007). Después de la digestión, el cccDNA migra como una molécula dsDNA lineal (2600 pb), mientras que las moléculas de ssDNA permanecerán sin modificar su migración (no se digieren). La Figura 13B muestra la migración típica de estas moléculas de DNA viral. El análisis de la imagen del gel nos muestra que el 70 % del DNA viral solubilizado de la fracción rica en núcleos es cccDNA (Fig. 13B). Para verificar los niveles de contaminación por cromatina del hospedero en el extracto enriquecido con minicromosoma viral, se realizaron detecciones por PCR usando oligonucleótidos específicos para el elemento multicopia, transposón Alien (Fig. 13C). Para confirmar la identidad del complejo núcleo-proteico como estructura en forma de minicromosoma, se realizó una inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra histonas H3 y H2B que forman parte del octámero que conforman a los nucleosomas (Richmond & Davey, 2003). Los resultados de estas inmunoprecipitaciones, seguida de la cuantificación de qPCR hecha usando oligonucleótidos específicos para el virus, confirman que la metodología de extracción no disgrega la estructura de minicromosoma viral (Fig. 13D).

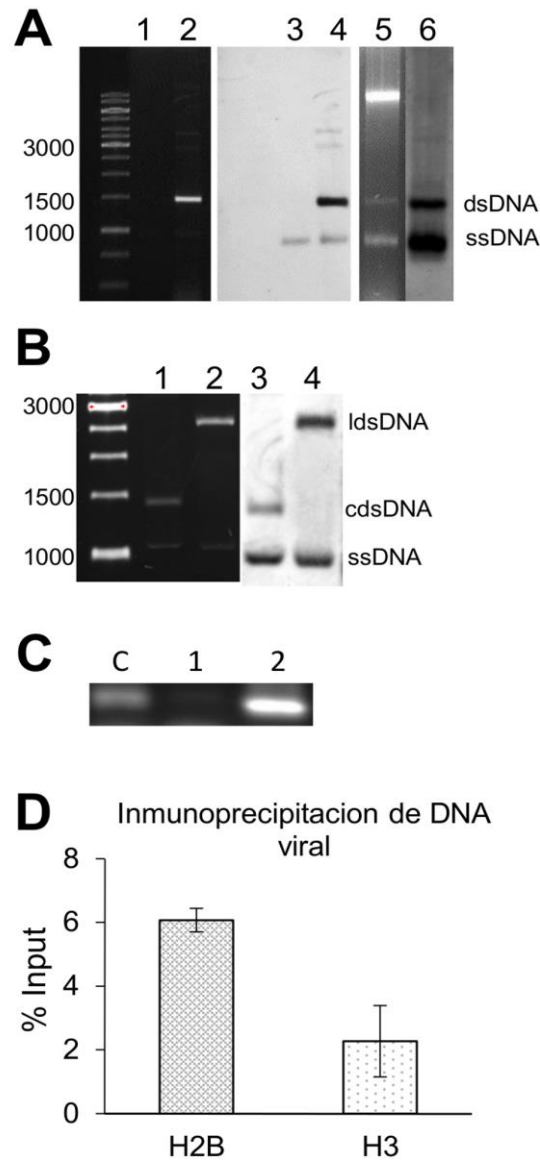


Figura 13. Extractos de núcleos tratados con Sarkosyl, enriquecidos con minicromosoma viral. **(A)** Gel de agarosa al 1% teñido con GelRed. Línea 1, DNA obtenido de núcleos tratados con Tritón X-100; línea 2, DNA obtenido de núcleos tratados con Tritón X-100 y Sarkosyl. Líneas 3 y 4, muestran la hibridación de las muestras anteriores, usando como sonda PepGMV A. Línea 5, extracto con CTAB de DNA total, con su respectiva hibridación. **(B)** Para verificar la identidad de las moléculas de DNA viral, DNA obtenido de extracto de Sarkosyl fue digerido con EcoRI. Línea 1, control sin digerir; línea 2, Extracto digerido con EcoRI. Líneas 3 y 4, son los resultados obtenidos de la hibridación de las líneas 1 y 2. Las formas de DNA viral están etiquetadas como doble cadena lineal (lds), doble cadena circular (cds) y cadena sencilla (ss). **(C)** PCR para detectar un elemento transposon en Chile (Alien). Línea 1, Control positivo, DNA genómico; línea 2, DNA del extracto de Sarkosyl; línea 3, DNA del sedimento obtenido después del tratamiento con Sarkosyl. **(D)** Cuantificación (por PCR tiempo real) del DNA viral (extracto con Sarkosyl) inmunoprecipitado usando anticuerpos contra H2B y H3. Los datos se presentan como porcentaje de input.

Recientemente se ha desatado un debate entre diferentes grupos de investigación en geminivirus sobre si la molécula viral cccDNA (minicromosoma) se encuentra o no metilada, y este debate se debe a que este tipo de molécula no se habia podido aislar, y por lo tanto analizar (Paprotka et al., 2011; Paprotka et al., 2015; Pooggin, 2013). Para ayudar a resolver esta cuestión, y dado a que nuestra metodología facilita la obtención de este tipo de molécula viral, decidimos purificar el cccDNA viral directamente del gel de agarosa y digerirla con la enzima dependiente de metilación McrBC. Esta enzima solo corta DNA de doble cadena que se encuentre metilado. El DNA sin digerir y digerido se cuantifico por PCR tiempo real usando oligonucleótidos específicos para el virus. En la Figura 14, se muestran los resultados obtenidos, alrededor del 90% de las moléculas de cccDNA viral tiene alguna metilación. Con esto podemos concluir que la molécula cccDNA viral o minicromosoma, si esta siendo metilada.

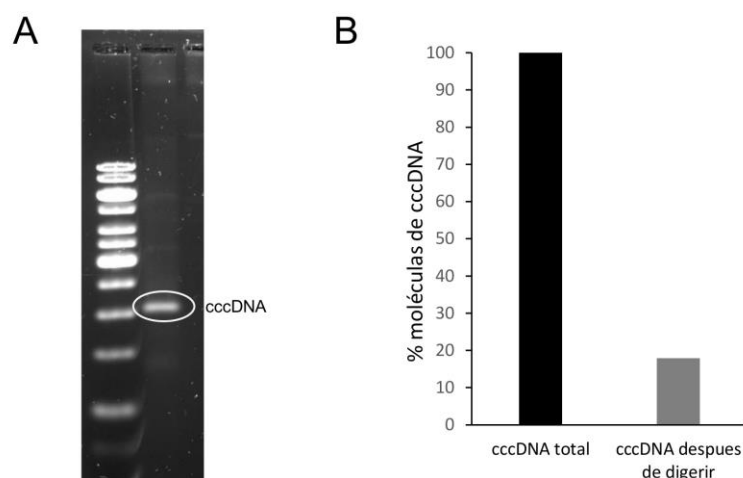


Figura 14. Análisis de metilación de cccDNA viral por digestión con McrBC. A) Purificación de DNA de extracto con Sarkosyl. La banda correspondiente a cccDNA se identificó y purifico del gel de agarosa al 1%. El cccDNA se digirió con la enzima dependiente de metilación McrBC (37°C / 8h). El DNA viral se cuantificó por PCR tiempo real, sin digerir y después de la digestión (**B**).

5.3 Minicromosoma viral de tejido sintomático y en remisión.

El fenómeno de remisión de síntomas que ocurre de forma natural en el sistema de estudio PepGMV-*Capsicum annuum* que se caracteriza por, la presencia de siRNA (21-24nt), la reducción de DNA y RNA viral, y aumento en los niveles de metilación en DNA viral (Rodríguez-Negrete et al., 2009; Carrillo-Tripp et al., 2007). Es posible que el DNA viral con altos niveles de metilación pueda estar asociado a minicromosomas con estructuras condensadas, esta relación entre altos niveles de metilación del DNA y una alta compactación ha sido observada en la heterocromatina. Mientras, que el DNA viral presente en tejido sintomático muestra un bajo nivel de metilación, esto puede deberse a que la estructura de minicromosoma se encuentre en una forma de cromatina relajada que facilita los procesos de replicación y transcripción del virus.

Para probar esta hipótesis, se obtuvo un extracto rico en cccDNA viral tanto de tejido sintomático como tejido en remisión, y se compararon algunas de sus características. Primero se realizó un análisis de sus propiedades de sedimentación en un gradiente discontinuo de sacarosa. Reportes en células HeLa y eritrocitos de pollo, indican que se puede diferenciar estructuras tipo minicromosoma viral usando gradientes discontinuos de sacarosa (Tachiwana et al., 2010; Kamakaka & Thomas 1990), porque la tasa de sedimentación está definida por su densidad (peso/volumen). Esto quiere decir que un minicromosoma condensado migrará al fondo del tubo donde se encuentra una mayor densidad, mientras que un minicromosoma relajado migrará hasta una zona de baja densidad (Gilbert et al., 2004).

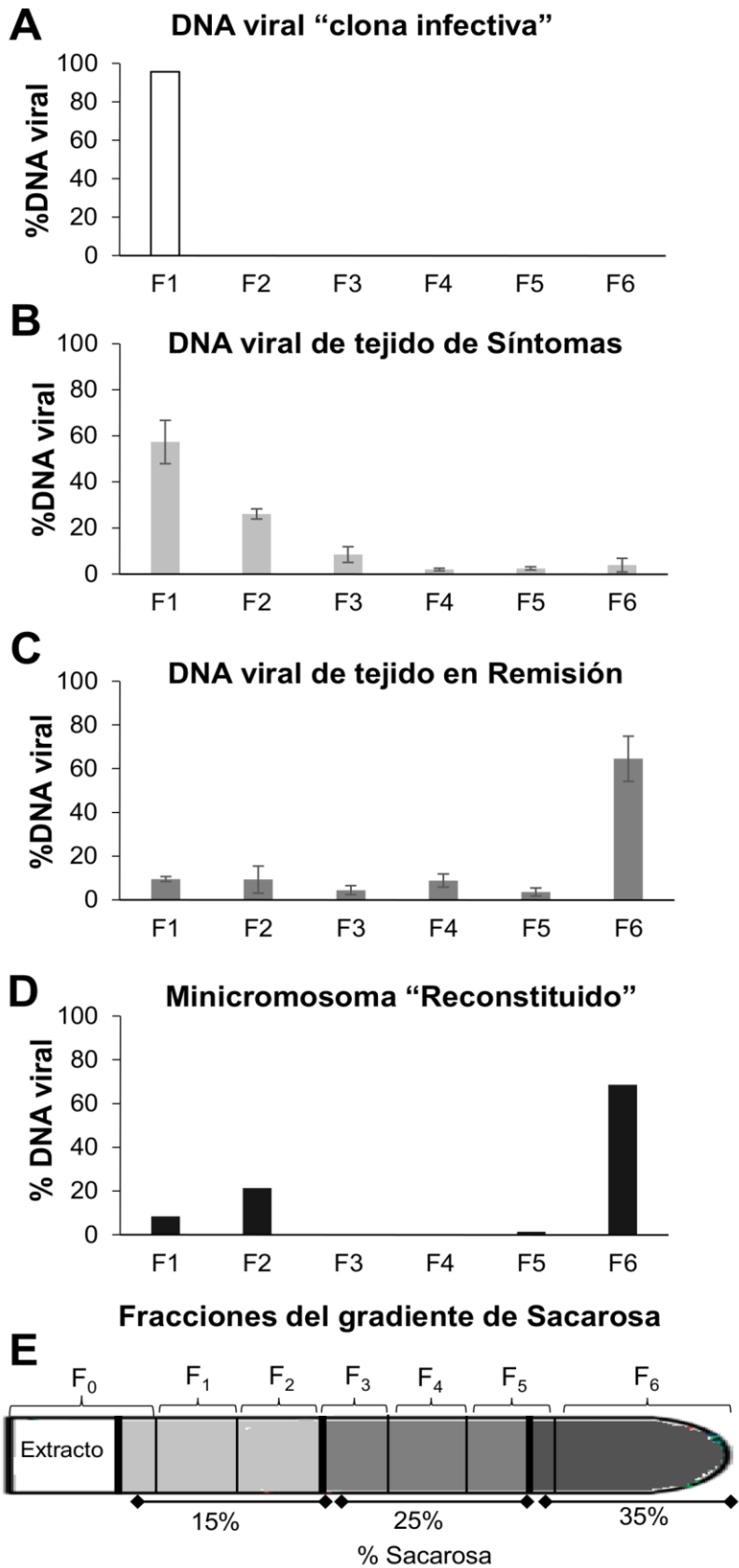
El extracto de minicromosoma viral obtenido de tejido sintomático y en remisión, se sometió a centrifugación sobre un gradiente discontinuo de sacarosa. Se colectaron 6 fracciones tal como se muestra en la Figura 15F, y se cuantificó el DNA viral por PCR en tiempo real. Los datos muestran que en extractos provenientes de tejido sintomático, entre el 50 – 70% de cccDNA viral se encuentra presente en las fracciones 1 y 2, las cuales están en la zona de baja densidad (15% sacarosa) (Fig. 15B), mientras del 55 -75 % de cccDNA viral proveniente de tejido recuperado se encontró en la zona de alta densidad, fracción 6 (35% sacarosa) (Fig. 15C). Este resultado nos sugiere que el cccDNA viral encontrado en tejido sintomático se encuentra en una estructura de minicromosoma relajado (activo), mientras que el cccDNA viral obtenido de tejido en remisión se encuentra en una estructura de minicromosoma condensado (inactivo).

Para sustentar esta conclusión, se utilizaron dos controles en el análisis de sedimentación que fueron incluidos en tubos paralelos al ensayo. El primero consiste de una muestra de DNA viral sin proteínas asociadas, clona dimérica de PepGMV A. El DNA viral libre mostró una baja tasa de sedimentación en estas condiciones, ya que se encontró en la fracción 1, de baja densidad (Fig. 15A). El segundo control consiste de un minicromosoma reconstituido artificialmente obtenido al mezclar una clona monomérica de PepGMV A con una mezcla de histonas comerciales (sigma H9250; H2A, H2B, H3, H4 y H1). Para verificar la estructura del minicromosoma reconstituido, se realizó una digestión con la enzima nucleasa micrococcal y se analizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Este minicromosoma reconstituido se cargó en un gradiente discontinuo

de sacarosa tal como se ha descrito arriba. La cuantificación de DNA viral muestra que, en este caso, la mayor cantidad de DNA viral es recuperado en la fracción 6 de alta densidad (Fig. 15D).

Con esta separación por gradiente de sacarosa se identificaron dos fracciones donde se concentraba alrededor del 70% del total del minicromosoma viral tanto de síntomas (Fraccion 1; **F1S**) como en remisión (Fraccion 6; **F6R**) (Fig 15B y C). Estas dos poblaciones de minicromosoma viral fueron seleccionadas para su análisis porque contrastan en su tasa de sedimentación, lo cual nos sugiere que son dos poblaciones de minicromosoma viral diferentes, una en tejido con síntomas que contiene un “bajo numero de nucleosomas” (estructura relajada) (F1S) y otra en tejido en remisión que contiene un “alto numero de nucleosomas” (estructura condensada) (F6R).

Figura 15. Identificación de dos poblaciones virales en plantas infectadas con PepGMV. Cuantificación por PCR cuantitativo de las moléculas de DNA viral presentes en cada una de las fracciones colectadas del gradiente discontinuo de sacarosa (15%, 25% y 35% de sacarosa). **(A)** DNA viral sin proteínas asociadas (dímero; clona infectiva). **(B)** DNA viral de extracto de tejido sintomático. **(C)** DNA viral de extracto de tejido en remisión. **(D)** Minicromosoma reconstituido (monómero + histonas comerciales). **(E)** Esquema del gradiente de sacarosa, las fracciones fueron colectadas como se indican en esta figura. Los datos son de tres experimentos independientes **(B y C)**. En cada caso, la escala en Y representa la concentración relativa de DNA viral en cada fracción del respectivo gradiente.



5.4 Cuantificación de dsDNA y ssDNA viral de F1S y F6R.

Para corroborar que el DNA viral presente en F1S y F6R es dsDNA, se realizó una cuantificación de moléculas de cadena sencilla (ssDNA) y de cadena doble (dsDNA) usando un análisis de qPCR, siguiendo el protocolo descrito para TYLCV (Rodríguez-Negrete et al., 2014). Este proceso se basa en etiquetar de manera independiente las dos cadenas del DNA viral (orientación en sentido al virión y complementario), y su cuantificación absoluta por PCR tiempo real.

Para verificar la eficiencia del proceso, primero se analizó la presencia de ss y dsDNA en un extracto de DNA total de tejido de plantas infectadas con PepGMV cuando se encuentra expresando los síntomas típicos severos. La figura 16A muestra que alrededor del 90 % del DNA viral aislado de la planta infectada se encuentra en forma ssDNA. Este resultado es similar al reportado en TYLCV infectando *Nicotiana benthamiana* y tomate, donde alrededor del 99 % del DNA de TYLCV es encontrado en forma ss (Rodríguez-Negrete et al., 2014). Así que, al corroborar que esta metodología funciona también para nuestro sistema, se utilizó para analizar el DNA viral presente en la F1S y F6R. Los datos nos muestran que alrededor del 95% del DNA viral se encuentra en forma dsDNA en estas fracciones (Fig. 16B, C), por lo tanto esto confirma que el DNA viral purificado es dsDNA asociado con histonas y forma un minicromosoma.

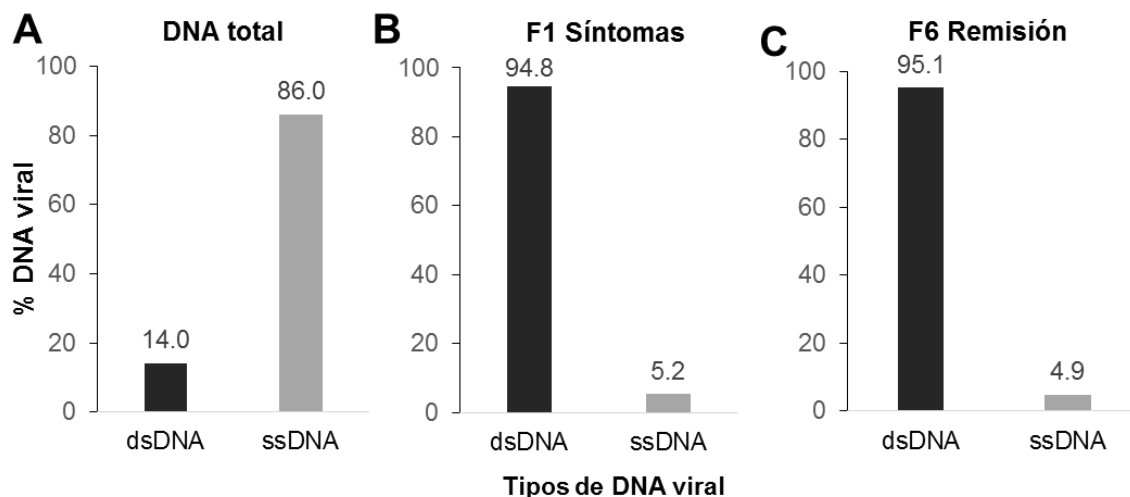


Figura 16. Cuantificación de DNA viral de cadena sencilla (ss) y cadena doble (ds) en las fracciones F1S y F6R. (A) DNA total obtenido de tejido infectado con PepGMV, similar al mostrado en la figura 2A líneas 5 y 6; (B y C) DNA obtenido de las fracciones F1S y F6R del gradiente de sacarosa, que se muestran en la figura 13 (B y C). Los datos se expresan como porcentaje del total de moléculas cuantificadas.

5.5 Análisis de los niveles de metilación del minicromosoma viral de F1S y F6R por Bisulfito.

El análisis de sedimentación del minicromosoma viral (Fig. 15), sugiere que el virus obtenido de tejido sintomático tiene principalmente una estructura de minicromosoma relajado, mientras que el virus en tejido en remisión se encuentra en una estructura de minicromosoma condensado. Se conoce que una cromatina condensada se correlaciona con un DNA hipermetilado (Kashiwagi et al., 2011). ¿Es posible que esto también suceda en el minicromosoma viral? Para responder esto, se realizó un análisis de metilación de alta resolución de la región intergénica/CP de PepGMV A usando la técnica de conversión por bisulfito/secuenciación. Se analizaron el nivel de metilación de las muestras F1S y F6R (Fig. 17).

Al observar el porcentaje de citosinas metiladas en F1, éste resultó bajo (6.4%), mientras que el porcentaje de citosinas metiladas en F6R fue alto (89.3%) (Fig. 17C). Al comparar los tres tipos de metilación, se observaron proporciones similares para los tres: 4.72, 6.54 y 6.99 % para CG, CNG y CHH respectivamente para la muestra F1S; 91.21, 91.23 y 87.88 % para CG, CNG y CHH para la muestra F6R. La distribución de las citosinas metiladas sobre el fragmento analizado se muestra en la figura 17B.

Al analizar estos datos de metilación y contrastarlos con los resultados previamente publicados (Rodríguez-Negrete et al., 2009), las marcas de metilación obtenidas en este trabajo son altamente homogéneas. En trabajos previos, el DNA usado para el análisis de metilación es DNA total, extraído directamente del tejido infectado, a diferencia de este trabajo en el cual se realizó una purificación, además de un fraccionamiento del minicromosoma viral.

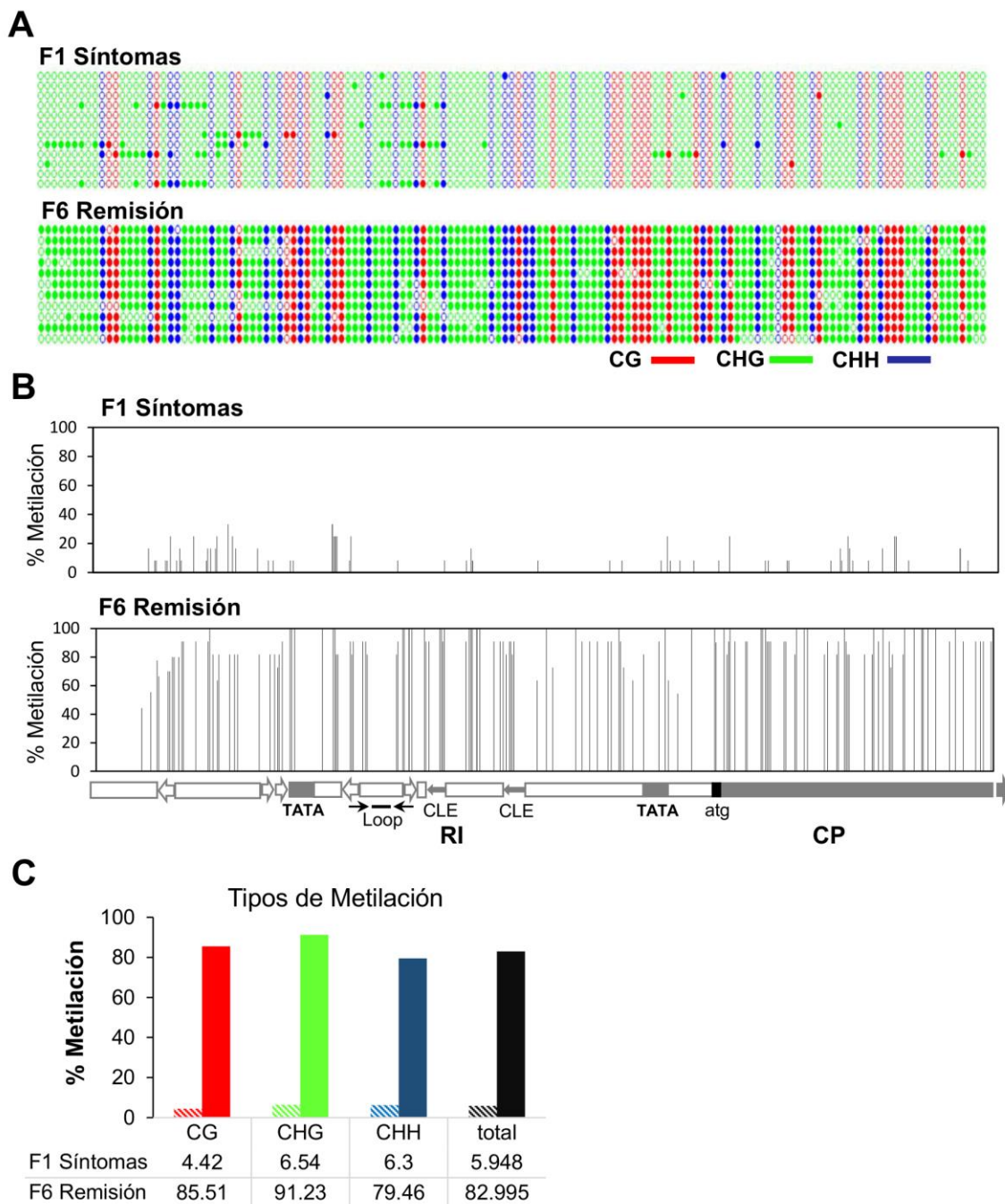


Figura 17. Análisis de alta resolución de los niveles metilación de las muestras F1S y F6R. El DNA obtenido de las fracciones F1S y F6R, fue tratado con bisulfito y secuenciado. **(A)** Los círculos de la gráfica representan todas las citosinas presentes en el fragmento de 580 nt (337 nt de la región intergénica y 183 nt del gen CP). Los colores representan los diferentes contextos de las citosinas (CG, rojo; CHG, verde y CHH, azul). Los círculos rellenos indican metilación, y cada línea representa una clona individual secuenciada (12 clonas por condición). **(B)** El porcentaje de metilación de cada citosina se calculó para cada estadio. Cada barra representa la posición de una citosina en el fragmento RI/CP. El mapa muestra la ubicación de los principales motivos (estructura tallo-asa, cajas TATA para Rep y CP; CLE). **(C)** Distribución de la metilación de las citosinas en las secuencias analizadas.

Estos resultados arrojan mayor evidencia de la correlación directa que existe entre la estructura del minicromosoma, su nivel de metilación y el fenómeno de remisión de síntomas (Raja et al., 2010; Rodríguez-Negrete et al., 2009; Raja et al., 2008).

5.6 Modificaciones de histonas en el minicromosoma viral de F1S y F6R.

La estructura de la cromatina activa (relajada) o reprimida (condensada), en lo que respecta a los procesos de transcripción y replicación, también se correlaciona con modificaciones post-traduccionales específicas en histonas (Swygert & Peterson, 2014; Bannister & Kouzarides, 2011). Por lo tanto, se procedió a analizar la presencia de dos modificaciones post-traduccionales que están asociadas directamente a la cromatina activa o reprimida. El ensayo consiste en hacer la inmunoprecipitación de las muestras F1S y F6R, con anticuerpos que reconocen dos modificaciones post-traduccionales de histonas: H3K4me3 (activa) y H3K9me2 (reprimida). El DNA viral inmunoprecipitado se cuantifica por qPCR. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 18. Los datos revelan que en la F1S, la mayor cantidad de minicromosoma viral se encuentra asociado a H3K4me3 que a H3K9me2, esto correlaciona con una cromatina activa o relajada. Por otro lado, en la muestra F6R, se observa que la mayor parte del minicromosoma se asocia a la modificación de histona que se correlaciona a una estructura de la cromatina condensada la H3K9me2.

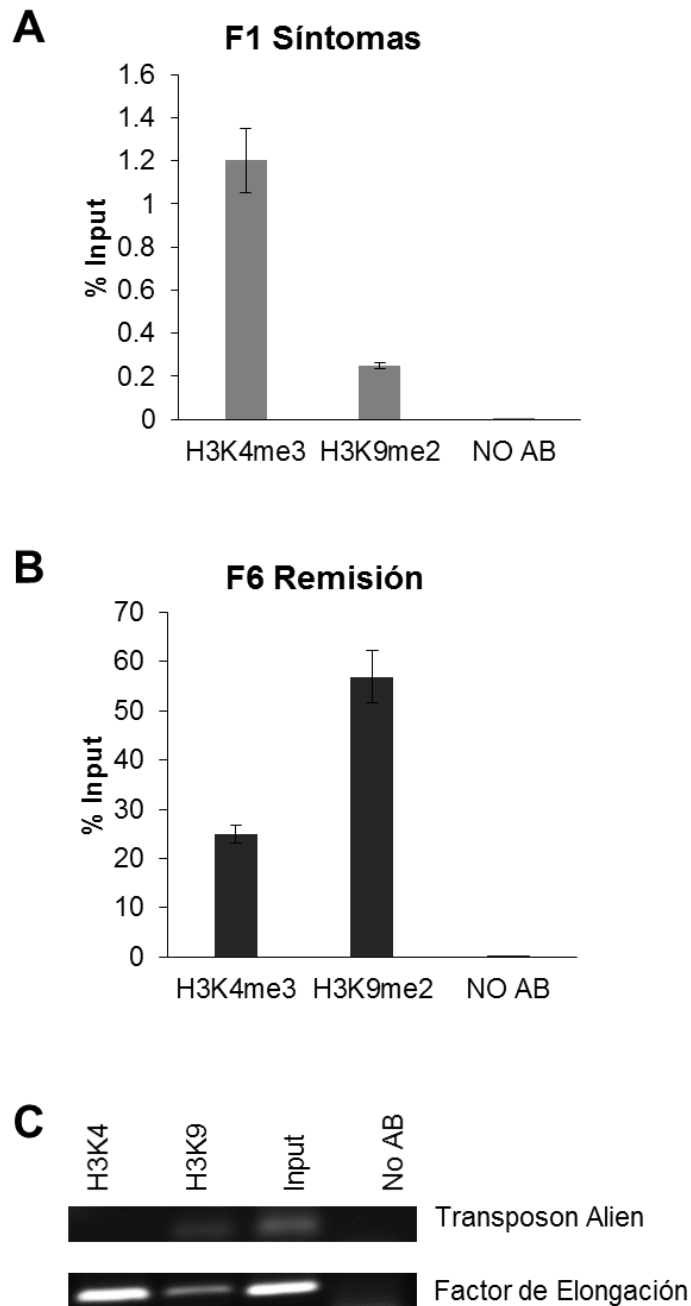


Figura 18. Análisis de modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a activación o represión en las poblaciones de minicromosoma viral de las fracciones F1S y F6R. Se realizó la inmunoprecipitación usando anticuerpos contra H3K4me3 y H3K9me2, seguida por cuantificación por PCR, usando oligonucleótidos específicos para PepGMV. **(A)** F1S y **(B)** F6R. Los datos se presentan como porcentaje de input. No Ab, misma muestra de cromatina (F1S y F6R) pero sin anticuerpo. **(C)** Como control, se usaron los mismos anticuerpos para inmunoprecipitar regiones de la cromatina del hospedero que son conocidas, y que se encuentran en estado condensado/reprimido (Transposón Alien) o relajado/activo (Factor de elongación).

5.7. Identificación de proteínas asociadas al minicromosoma viral.

Para tratar de elucidar qué factores del hospedero podrían estar involucrados en las modificaciones del minicromosoma viral, nos dimos a la tarea de purificar las proteínas de los complejos obtenidos de las fracciones 1 de síntomas (F1S) y 6 de remisión (F6R). Las proteínas se digirieron con tripsina y los péptidos se separaron por HPLC en el instrumento ACELLA. Los péptidos fueron identificados en el espectrómetro de masas LTQ Velos Ion-Trap. Los datos obtenidos se analizaron con el programa Trans-Proteomic Pipeline, utilizando la base de datos de proteínas de *Arabidopsis* de Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) (detalles en la sección 4.9 de metodología).

Para la F1S se encontraron un total de 647 posibles proteínas, pero al hacer la valoración de número de péptidos independientes y el porcentaje de cobertura, el número se redujo a 166 proteínas. De manera similar, para F6R se obtuvo un total de 706 proteínas candidatas, después de valorarlas se obtuvieron 233 proteínas. En total, se encontraron 96 proteínas asociadas únicamente al minicromosoma en síntomas, 163 proteínas asociadas al minicromosoma en remisión, mientras que 70 proteínas estuvieron presentes en las dos fracciones (Fig. 19). Del total de proteínas identificadas solo el 3% correspondieron a proteínas en cloroplasto y el 2% a mitocondria, por lo tanto encontramos solo alrededor del 5% de proteínas se pueden considerar como contaminación en la extracción de núcleos. De las proteínas asociadas a la fracción con el minicromosoma, tanto de síntomas como de remisión se encontraron los siguientes grupos: Proteínas relacionadas a la replicación del DNA (ej. Proteína relacionada al Retinoblastoma), 15.5%; Proteínas relacionadas a

la transcripción (ej. RNA polimerasa), 15.5%; Proteínas relacionadas a silenciamiento génico ya sea **TGS** [ej. Histona H3K9 metiltransferasa (SUVH5)] o **PTGS** [ej. Argonauta 2], 19.7%; Proteínas asociadas a activación (ej. Histona acetiltransferasas), 7.0%; Proteínas relacionadas a la estructura de cromatina (ej. histonas y remodeladores de cromatina), 9.9%; Proteínas asociadas a la reparación del DNA (ej. DNA Helicasa INO80), 5.6%; Proteínas de respuesta a estrés (ej. proteína supresora de npr1), 4.2%; Proteínas relacionadas a transposones (ej. Transcriptasa reversa), 11.2%; Proteínas asociadas al mecanismo de degradación de proteínas (ej. 26S Proteosoma, subunidades 14, 7 y 1A), 4.2% (Tabla 2, Fig. 20A y Anexo Tabla 1).

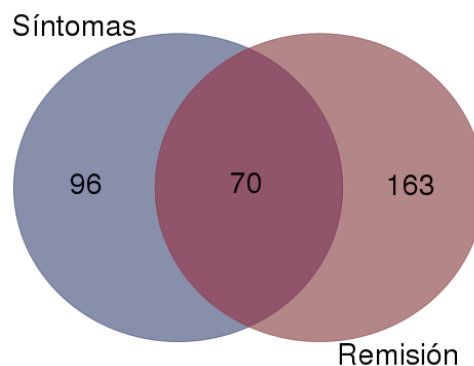


Figura 19. Esquema de conjuntos de las proteínas asociadas al minicromosoma en síntomas y remisión, mostradas en un diagrama de Venn.

Las proteínas que solo se encontraron en el minicromosoma viral de Síntomas fueron; Proteínas relacionadas a replicación del DNA (ej. DNA Polimerasa alfa), 10.1%; Proteínas asociadas a transcripción (ej. factores de transcripción MYB), 22.2%; Proteínas relacionadas a silenciamiento génico (ej. Histona H3K9 metiltransferasas (SUV1, SUV4 (KYP) y SUV6), 20.2%; Proteínas relacionadas a

activación de genes (ej. histona metiltransferasa H3K4), 5.1%; Proteínas relacionadas a la cromatina (ej. SWI/SNF), 13.1%; Proteínas relacionadas a respuesta a estrés (ej. histona desacetilasa 19), 9.0%; Proteínas relacionadas a transposones (ej. RNA polimerasa dependiente de DNA), 6.1%; Proteínas asociadas a la degradación de proteínas (ej. 26S proteasoma, subunidades 12, 7A, 7B y 10B), 5.1%; y el 2% de proteínas virales (Proteína potenciadora de la replicación (REn) y la Proteína del Movimiento (MP)) (Tabla 2, Fig. 20B y Anexo; Tabla 2).

Proteínas asociadas al minicromosoma de Remisión; Proteínas relacionadas a replicación del DNA (ej. DNA polimerasa delta), 15.3%; Proteínas asociadas a transcripción (ej. RNA polimerasa sigma (factores C, D y E)), 27.6%; Proteínas relacionadas a represión o silenciamiento génico (ej. 5-citocina-DNA-metiltransferasas (DMT1 y CMT2)), 11.0%; Proteínas relacionadas a activación de genes (ej. histona acetiltransferasas 1, 2 y 12), 10.4%; Proteínas relacionadas a cromatina (ej. remodelador de la cromatina CHD3), 11.0%; Proteínas relacionadas a reparación del DNA (ej. proteína Nijmegen breakage), 3.7%; Proteínas relacionadas a respuesta a estrés (ej. mediador de la RNA polimerasa II subunidades 8 y 16), 3.7%; Proteínas relacionadas a transposones (ej. DNA polimerasa dependiente de RNA), 6.7%; Proteínas asociadas al mecanismo de degradación de proteínas (ej. Enzima conjugadora de ubiquitina E2), 1.8% (Tabla 2, Fig. 20C y Anexo; Tabla 3).

Tabla 2. Anotación por función biológica de las proteínas asociadas al minicromosoma de Síntomas y Remisión

Proteínas Relacionadas	Ambos	Síntomas	Remisión
Replicación	15.5% Proteínas relacionadas al Retinoblastoma	10.1% DNA Polimerasa alfa, DNA girasa y DNA topoisomerasa	15.3% DNA topoisomerasa 6, proteína-replicación A, DNA polimerasa delta y DNA polimerasa 1
Transcripción	15.5% RNA polimerasa y factores de transcripción	22.2% RNA polimerasa II, factores de transcripción MYB, de iniciación TFIID y de elongación SPT6	27.6% Mediador de la RNA polimerasa II, subunidades: 12, 33B, 9, 26C y 34, factor específico de corte y poliadenilación subunidad 1 y 2, nuclear poli-A polimerasa, RNA polimerasa sigma (factores C, D y E) y RNA polimerasas I y II
Silenciamiento génico	19.7% Histona H3K9 metiltransferasa (SUVH5), RNA Polimerasa V, AGO 4, AGO 2, RNA Polimerasas dependientes de RNA (RDR3/RDR4), IDN2 (Involved in DE NOVO 2)	20.2% E3 ubiquitin ligasa, histona H3K4 desmetilasa, histona H3K9 metiltransferasas (SUV1, SUV4 (KYP) y SUV6), 5-citosina-DNA-metiltransferasa (MET3), histona H3K27 metiltransferasa, Endoribonucleasa DICER 3 y proteína de unión a metil-CpG	11.0% Histona desmetilasa JMJ15, histona metiltransferasa H3K9 (SUVH3), remodelador de la cromatina, chaperona de histonas HIRA, Proteína19 con dominio dedo de zinc CCCH, RNA polimerasa IV (subunidad 1), 5-citocina-DNA-metiltransferasas (MET1 y CMT2/3), NERD, AGO1 y DRB2 (proteína de unión a dsRNA)
Activación de genes	7.0% Histona acetiltransferasas	5.1% Histona acetiltransferasa e histona metiltransferasa H3K4	10.4% Histona acetiltransferasas 1, 2 y 12, histona desmetilasa H3K27 e histona H3K4 metiltransferasa ATX1
Cromatina	9.9% Histonas y remodeladores de cromatina	13.1% Complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF	11.0% Remodelador de la cromatina CHD3, SWI/SNF subunidades 3C y BSH
Reparación/ Daño del DNA	5.6% DNA Helicasa INO80 y Switch 2	1.0% K8K14_4 y Sin3 - Like3	3.7% Proteína Nijmegen breakage, TONSOKU, DNA helicasa UVH6 y endonucleasa 1 Flab
Respuesta a Estrés	4.2% Proteína supresora de npr1 y serina/treonina cinasa	9.0% Histona desacetilasa 19, H3 acetiltransferasa y fact. de transcripción MYB101	3.7% Mediador de la RNA polimerasa II subunidades 8 y 16
Transposones	11.3% Transcriptasa reversa - Retrotransposon	6.1% RNA polimerasa dependiente de DNA	6.7% DNA polimerasa dependiente de RNA

Mecanismos de degradación de proteínas	4.2% 26S Proteosoma, subunidades 14, 7 y 1 ^a	5.1% 26S proteasoma sub 12, 7A, 7B y 10B	1.8% Enzima conjugadora de ubiquitina E2, 26S proteasoma sub 11 y 2 ^a
Otras		2.0% Proteínas virales REn y MP.	

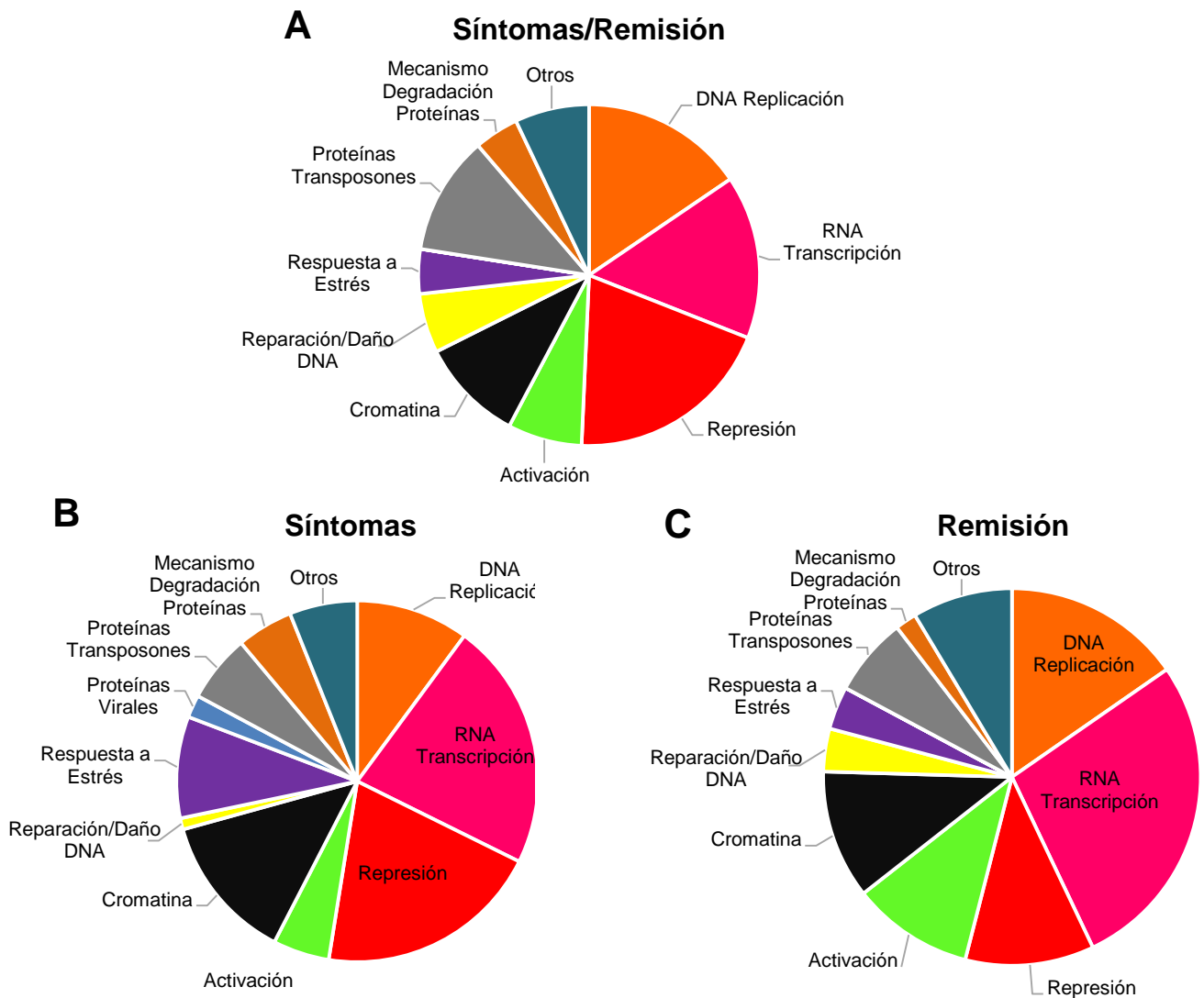


Figura 20. Clasificación por función biológica de las proteínas asociadas al minicromosoma de Síntomas y Remisión. Usando PANTHER (Gene Ontology Reference Genome Project) (Mi et al., 2005; Thomas et al., 2003). **(A)** Proteínas asociadas tanto en MCV de síntomas y remisión. **(B)** Proteínas asociadas al MCV de síntomas y **(C)** Proteínas asociadas al MCV de remisión.

VI. Discusión

El DNA geminiviral puede encontrarse en varios tipos de moléculas en células infectadas: DNA circular de cadena sencilla (ssDNA, virión; forma encapsidada), DNA lineal heterogéneo, que pueden ser productos de intermediarios de la replicación dependiente de recombinación, DNA circular de doble cadena (dsDNA, forma replicativa) el cual es usado como templado para la replicación y transcripción viral (Jeske et al., 2001). De todos estos tipos de DNA viral, el más abundante es el ssDNA, éste es el producto de la replicación y es encapsidado (partícula viral). El estudio de los geminivirus, en lo que respecta a la regulación de los procesos de transcripción y replicación, ha sido limitado por la baja concentración de minicromosoma viral que se puede obtener de tejido infectado. En este trabajo se implementó una metodología sencilla para obtener una fracción enriquecida de dsDNA viral asociado a histonas. Esto es, enriquecida con minicromosoma viral, sin alterar la conformación básica del mismo.

El uso de detergentes para solubilizar complejos virales ya ha sido empleado para obtener complejos núcleoproteicos en varios sistemas (Rivera-Bustamante & Semancik, 1989). Por ejemplo, se utilizó Triton-100X para aislar complejos DNA viral/histonas del virus 40 de simios (Simian virus 40, SV40) (Cremisi et al., 1975; Su et al., 1978). Este resultó ser un gran avance para el estudio de la estructura de la cromatina, y del rol de las histonas en el proceso de replicación en mamíferos

En nuestro análisis de sedimentación en gradiente de sacarosa, podemos observar la gran heterogeneidad de las estructuras del minicromosoma viral que se encuentran dentro del tejido infectado. El hecho de que el DNA viral que no está

asociado a proteínas (clona dimérica) haya migrado en la fracción 1 del gradiente de sacarosa, mientras que el dsDNA viral obtenido de tejido sintomático se distribuya entre las fracciones 1, 2 y 3, nos sugiere que en la fracción 1 existe una población heterogénea que refleja un número variable de nucleosomas asociados al dsDNA viral. Esta variabilidad también ha sido observada en otros geminivirus usando una metodología diferente. Por ejemplo, en *Abutilon mosaic virus* (AbMV), se observaron por microscopía electrónica minicromosomas que contenían desde 5 hasta 15 nucleosomas (Abouzid et al., 1988). En trabajos recientes con varios geminivirus (principalmente AbMV y TYLCV), basados en el análisis de topoisómeros observados en electroforesis en gel de 1D y 2D, se sugiere que la mayor parte del dsDNA está organizado en minicromosomas que contienen entre 12 y 13 nucleosomas (Paprotka et al., 2015).

Además de observar la heterogeneidad en las estructuras del minicromosoma viral obtenido de tejido sintomático, y al comparar éste contra el minicromosoma viral obtenido de tejido en remisión, podemos observar que existen dos poblaciones con una gran diferencia en su densidad (Fig. 15). Mientras que el minicromosoma de tejido sintomático migra a una zona de baja densidad (15 % sacarosa) el minicromosoma de tejido en remisión migra hacia una zona de alta densidad (35 % sacarosa) (Fig. 15, B y C). Esto indica que el minicromosoma viral que se encuentra en tejido en remisión tiene un número mayor de nucleosomas, por lo que posee una estructura más densa. Por su parte, el minicromosoma de tejido sintomático tiene un menor número de nucleosomas y posee una densidad menor. Los datos de la digestión con nucleasa micrococcal muestran que el minicromosoma

obtenido de tejido en remisión presenta una mayor resistencia a la digestión por la nucleasa micrococcal comparativamente con el minicromosoma de tejido sintomático, evidenciando la diferencia en la estructura del minicromosoma (Fig. 9). Esto resulta de gran relevancia, porque es el primer indicio que muestra que hay un efecto directo de la maquinaria de silenciamiento de la planta sobre la estructura de la forma replicativa geminiviral (minicromosoma). Esto también ha sido observado en otros sistemas virales. Por ejemplo, en el ciclo infectivo del *virus de herpes simplex*, este virus puede encontrarse en dos diferentes estadios: lisis y latencia. Se ha observado que cuando este virus se encuentra en lisis, su tasa de transcripción y replicación es elevada. Esta actividad ha sido asociada a una estructura de minicromosoma relajado, con pocos nucleosomas. Mientras que en estadio de latencia, la tasa de transcripción y replicación disminuye drásticamente, y se ha observado que el minicromosoma se encuentra condensado (Toth et al., 2010; Nevels & Nitzsche, 2011; Cliffe & Knipe, 2008). Algo similar también se ha observado en el virus de la hepatitis B (HBV) (Shi et al., 2012). En este caso, se determinó que la metilación del dsDNA en regiones reguladoras puede modular la expresión de sus genes (Zhang et al., 2014; Vivekanandan et al., 2009; Guo et al., 2009), pero si la metilación es inducida por RNAs pequeños (TGS), esta puede llegar a suprimir por completo la transcripción viral y además afectar de manera negativa la replicación viral (Park et al., 2011; Park et al., 2013). De manera similar, diferentes poblaciones de minicromosoma se observaron en la infección con el *virus de la hepatitis B del pato (Duck Hepatitis B Virus, DHBV)*. En ese estudio se encontraron 21 topoisómeros. De estos, dos grupos fueron los más abundantes: el primer grupo contenía de 8-10 nucleosomas, y se les relaciono con minicromosomas activos;

mientras que el segundo grupo que contenía entre 18-20 nucleosomas se correlacionó con minicromosomas inactivos (Newbold et al., 1995; Shi et al., 2012). Estos datos nos sugieren que la conformación del minicromosoma puede determinar la actividad transcripcional del virus.

Existe gran controversia entre diferentes grupos de investigación sobre la relevancia que puede tener o no la metilación del DNA viral en la replicación (Paprotka et al., 2011; Pooggin, 2013; Raja et al., 2010). Uno de los puntos que ha causado esta controversia, son los datos obtenidos sobre la metilación del DNA viral, que muestran una gran variabilidad entre el DNA viral obtenido de hoja sintomática y recuperada (entre 10 – 50%), además del hecho de que por el método usado, no se puede señalar cuál de las moléculas de DNA viral es afectada por metilación (Raja et al., 2008; Rodríguez-Negrete et al., 2009). Paprotka et al., (2011) muestran que las únicas moléculas virales que se encontraron metiladas en sus sistemas (Artificial: TYLCSV y AbMV infectando *N. benthamiana*, y natural: AbMV - plantas de *Abutilon sellovianum*), fueron DNA lineales heterogéneos que, como señalan los autores, son productos de la replicación dependiente de recombinación, en los cuales el hecho de encontrarlos metilados no tiene, aparentemente, relevancia biológica. Para elucidar el posible papel de la metilación del DNA viral en el fenómeno de remisión, nosotros primero confirmamos que el cccDNA/minicromosoma viral estuviera metilado, esto lo hicimos purificando el cccDNA viral del gel de agarosa, y digiriendo el DNA obtenido, con la enzima dependiente de metilación la McrBc, los datos obtenidos nos permiten concluir que el minicromosoma viral es blanco del silenciamiento génico transcripcional (TGS)

(Fig. 14). Además, los datos arrojados por el análisis de metilación en la región intergénica del minicromosoma viral por el método de bisulfito, nos muestran una importante diferencia, de alrededor del 83% de citosinas metiladas, entre el minicromosoma viral de tejido sintomático y de remisión. Estos resultados nos dan evidencia contundente de que el minicromosoma está sujeto a metilación represiva. Y al ser el minicromosoma la molécula clave para la transcripción y replicación viral, esto adquiere gran importancia.

Por otro lado, sabemos que existe una estrecha relación entre la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de histonas, y que la combinación de ambas produce un efecto de represión en regiones de la cromatina (Cedar & Bergman, 2009; Fuks, 2005; Du et al., 2015). Esto también es observado en la Figura 18, la correlación entre bajos niveles de metilación, con la marca de activación H3K4me3, en tejido sintomático. Mientras que por otro lado, encontramos altos niveles de metilación combinado con la marca de represión H3K9me2, en el minicromosoma obtenido de tejido en remisión. Aunque es cierto que dentro del minicromosoma viral de las dos condiciones (tejido en síntomas y remisión), se encuentran ambas modificaciones (H3K4me3 y H3K9me2), es la proporción entre ellas, lo que define el estatus de actividad en la cromatina. Trabajos recientes revelan que H3K4me induce la decondensación de la cromatina, facilitando con ello la entrada de endonucleasas que causan la ruptura en el DNA (double-strand breaks, DSBs) (Burman et al., 2015; Lieber, 2010). Si extrapolamos este dato al mecanismo de replicación viral, podemos hipotetizar que esta modificación (H3K4me3) podría estar preparando al minicromosoma para la entrada de la

proteína viral Rep, y esto facilite el corte en la cadena de DNA, que es indispensable para iniciar la replicación viral. Por otro lado, la metilación en H3K9 se ha visto envuelta en el silenciamiento de la transcripción en el *Virus de la hepatitis B* (HBV) por su efecto en la modulación de la estructura de la cromatina (Rivière et al., 2015). Además, estudios recientes muestran la correlación entre una estructura relajada de la cromatina con una actividad transcripcional alta, mientras que por otro lado, una estructura compacta de la cromatina es correlacionada con silenciamiento transcripcional (Boettiger et al., 2016).

Al analizar las proteínas asociadas al minicromosoma viral se lograron identificar varias relacionadas con replicación viral, regulación de la transcripción, silenciamiento génico, activación de genes, relacionadas a cromatina, transposones, proteínas relacionadas a daño del DNA y a estrés abiótico/biótico. Una de las proteínas que fue encontrada formando parte del minicromosoma tanto de tejido sintomático como en remisión es la relacionada a Retinoblastoma (Retinoblastoma-related protein 1; RBR). Esta es una proteína encargada de regular negativamente la entrada de la célula al ciclo celular (Gutzat et al., 2011). Se ha encontrado que las proteínas virales Rep y REn interactúan con RBR inactivándola (Kong et al., 2000). Estas interacciones reprograman el control del ciclo celular e inducen a células maduras a un endociclo o ciclo mitótico (Hanley-Bowdoin et al., 2013). Esta estrategia también es usada por el *Virus Epstein-Barr* (EBV) donde la proteína viral 3C forma un complejo con el proteasoma, degradando a la proteína RBR y estimulando así la proliferación celular (Knight et al., 2005). En otro caso, la proteína E7 del *Virus del papiloma humano* degrada a RBR por la ruta ubiquitin-

proteasoma (Boyer et al., 1996). Esta estrategia viral de inhibir o degradar la proteína RBR es usada para inducir el mecanismo de replicación del DNA del hospedero, y con ello favorecer su propia replicación.

Además, tanto en la fracción del MCV de tejido sintomático como tejido en remisión, se encontraron varias proteínas que forman parte del complejo de silenciamiento génico transcripcional (TGS): *ago4*, *rdr2* y la histona H3K9 metiltransferasa. Plantas de *Arabidopsis* mutantes en estos tres genes resultaron hipersensibles a la infección por geminivirus. En este estudio, estas mutantes mostraron una disminución en los niveles de metilación de la región intergénica viral (Raja et al., 2008). Varios trabajos muestran que el DNA de los geminivirus (ToLCV, TGMV, BCTV, CaLCuV, MBYV y PepGMV) es metilado durante la infección (Bian et al., 2006; Seemanpillai et al., 2003; Raja et al., 2008; Rodríguez-Negrete et al., 2009). Además, se ha observado que varios tipos de RNAs pequeños (siRNAs) son producidos en infecciones con geminivirus. Los siRNAs de 23-24nt son producidos principalmente por DICER 3, estos guían la metilación del DNA, y se ha demostrado que provienen de la región intergénica viral (Akbergenov et al., 2006; Blevins et al., 2006; Rodríguez-Negrete et al., 2009). DICER 3 fue encontrada solo en el MCV de tejido sintomático (153 péptidos únicos), esto concuerda con la producción exponencial de siRNA de 24nt observada en tejido sintomático (Trejo-Saavedra, datos no publicados). Otra proteína encontrada solo en MCV de tejido sintomático, es la histona H3K9 metiltransferasa; KYP (SUVH4). KYP coloca marcas de metilación (H3K9me2) que reclutan o permiten la unión de la cromometiltransferasa CMT3 (o viceversa), esta a su vez metila el DNA en contexto CHG (H = C, T o A)

(Du et al., 2014). CMT3 solo fue encontrada en el MCV de tejido en remisión, esto puede deberse a que primero KYP metila a la lisina 9 de la histona H3 y esta marca permite que CMT3 se integre al MCV, y metila el DNA viral. Estudios recientes muestran, 1) inhibir a KYP facilita la infección de varios geminivirus, 2) KYP, CMT3 y AGO1 controlan el mecanismo de TGS en *Nicotiana Benthamina* (Sun et al., 2015). Además, se encontró el remodelador de la cromatina CHD3, asociado a MCV de tejido en remisión. CHD3 reconoce la modificación post-traducciona H3K9me2 y agrega nucleosomas en esa región. Es posible que el remodelador CHD3 este condensando la estructura del MCV del tejido en remisión. Estudios muestran, que al silenciar a CHD3 (en células HeLa) e infectarlas con el virus del herpes simplex (HSV-1), se potencia la actividad transcripcional del virus (Arbuckle & Kristie, 2014). Además, CHD3 promueve la insolubilidad del genoma de HSV en ensayos de FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements)(Giresi et al., 2007), es decir, CHD3 agrega nucleosomas al genoma viral, y con ello lo reprime (Lee et al., 2016).

El encontrar estas proteínas que componen al complejo de silenciamiento génico transcripcional (TGS) asociadas al minicromosoma viral (MCV), concuerda con los niveles de metilación observados en la región intergénica del MCV (Fig. 16). El aumento del 83% de citosinas metiladas en el MCV de tejido en remisión sobre el MCV de tejido sintomático, da evidencia que el TGS está formando parte clave en la defensa de la planta sobre el virus. Pero, al encontrar este complejo de TGS también asociado al MCV obtenido de tejido sintomático, que además muestra el 6% de citosinas metiladas (Fig. 17C), podemos hipotetizar que el ataque del sistema

de defensa de la planta sobre el MCV inicia en el estadio de síntomas, y se mantiene hasta remisión. Eso podría explicar el por qué al hacer el análisis comparativo del transcriptoma de plantas de Chile infectadas con PepGMV, no se encuentran diferencias entre los dos estadios, síntomas y remisión (Góngora-Castillo et al., 2012).

Al hacer el recuento global de las proteínas encontradas en el MCV podemos observar que existen varias relacionadas tanto a represión como a activación transcripcional, esto se debe a que las marcas epigenéticas no son únicas, sino es el balance entre ellas las que modulan la actividad transcripcional de ciertas regiones de la cromatina, a esto se le ha denominado el código de histonas (Young et al., 2010; Young et al., 2009).

Entre las proteínas asociadas al MCV, se encontraron varias proteínas asociadas a respuesta a estrés. El factor de transcripción MYB y la histona desmetilasa 19 se encuentran envueltas en la señalización por ácido jasmónico. Datos recientes muestran, al ácido jasmónico como la principal respuesta ante la infección de PepGMV en plantas de *Capsicum annuum* (Bárcenas-Rodríguez, datos no publicados).

Con estos datos, podemos concluir que el minicromosoma viral está sujeto a un nivel blanco de metilación de DNA represiva, además de modificaciones post-traduccionales de histonas que pueden estar regulando su estructura. Sin embargo, hay que considerar que esta conformación es dinámica, y puede ser afectada por

factores de defensa del hospedero, o por mecanismos de regulación propia del virus, o ambos.

Estudios previos en nuestro laboratorio, se han concentrado en los estadios de síntomas y de remisión, porque se pensaba que el virus en tejido sintomático se encontraba en su máxima tasa de actividad al contrario al virus en tejido en remisión donde su actividad caía al mínimo, y esta actividad viral, se reflejaba en el fenotipo (Fig. 21). Cabe señalar que la determinación de estos estadios es completamente visual. Sin embargo, los síntomas son solamente una manifestación de procesos bioquímicos y moleculares en las células, que deben de iniciar antes de que los síntomas sean visibles. Para que los síntomas se puedan visualizar, la hoja debe de tener un tamaño lo suficientemente grande para ser observada, pero la morfología ya fue determinada durante el desarrollo de la hoja. Es en esos momento la infección ya ha actuado y ha afectado el desarrollo de la hoja.

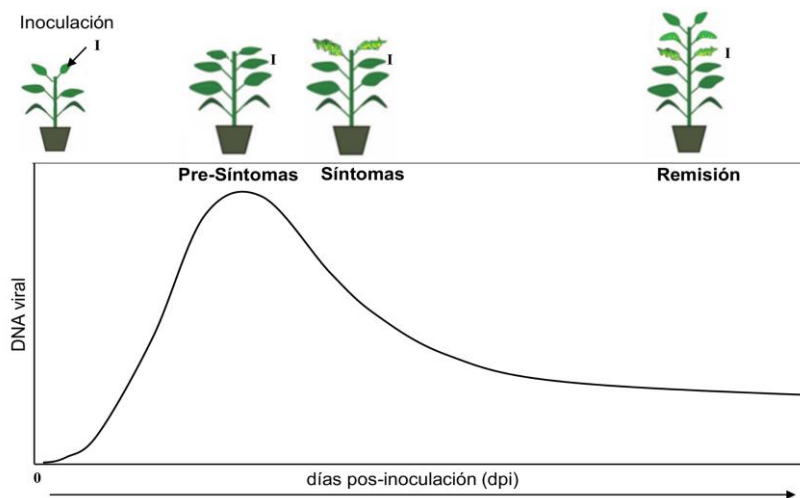


Figura 21. Esquema que muestra el estado de actividad viral vs efecto en el fenotipo observado (sintomático). Se inocula el virus PepGMV en la 3 o 4 hoja verdadera de la planta de chile, el virus alcanza su máxima tasa de replicación y transcripción en el estadio pre-sintomático. Después de esa etapa, la actividad viral empieza a decaer, hasta que llega a un nivel significativamente bajo en el estadio de remisión.

Con los datos obtenidos sobre los niveles de metilación, la estructura de la cromatina viral y las proteínas asociadas a esta, tanto en tejido sintomático como en remisión, proponemos el siguiente modelo de la actividad del minicromosoma viral (MCV) de PepGMV durante su ciclo infectivo en *Capsicum annuum*: El minicromosoma viral en tejido pre-sintomático se encuentra con una estructura relajada, alcanzando su máxima tasa de replicación y transcripción viral, provocando con ello, los síntomas característicos de la infección. Este ritmo de actividad viral, desata la respuesta de defensa de la planta. La planta despliega la maquinaria de silenciamiento génico contra el virus. Primero se generan siRNAs de 21 y 24 nt (Rodríguez-Negrete et al., 2009). Aunque los siRNAs de 21 nt principalmente actúan en la ruta de PTGS, se ha visto que también pueden establecer la metilación del DNA (ruta no-canónica RdDM; donde actúan AGO1 y AGO2). El MCV es hipermetilado y se establecen las modificaciones en las histonas H3K9me2 (además, ¿H3K27me?). El remodelador de la cromatina CHD3 reconoce las marcas H3K9me2, se une al MCV y deposita nucleosomas, lo que tiene como resultado un MCV condensado y reprimido. Esta represión del MCV es lo que conlleva a una recuperación o remisión de síntomas (Fig. 22).

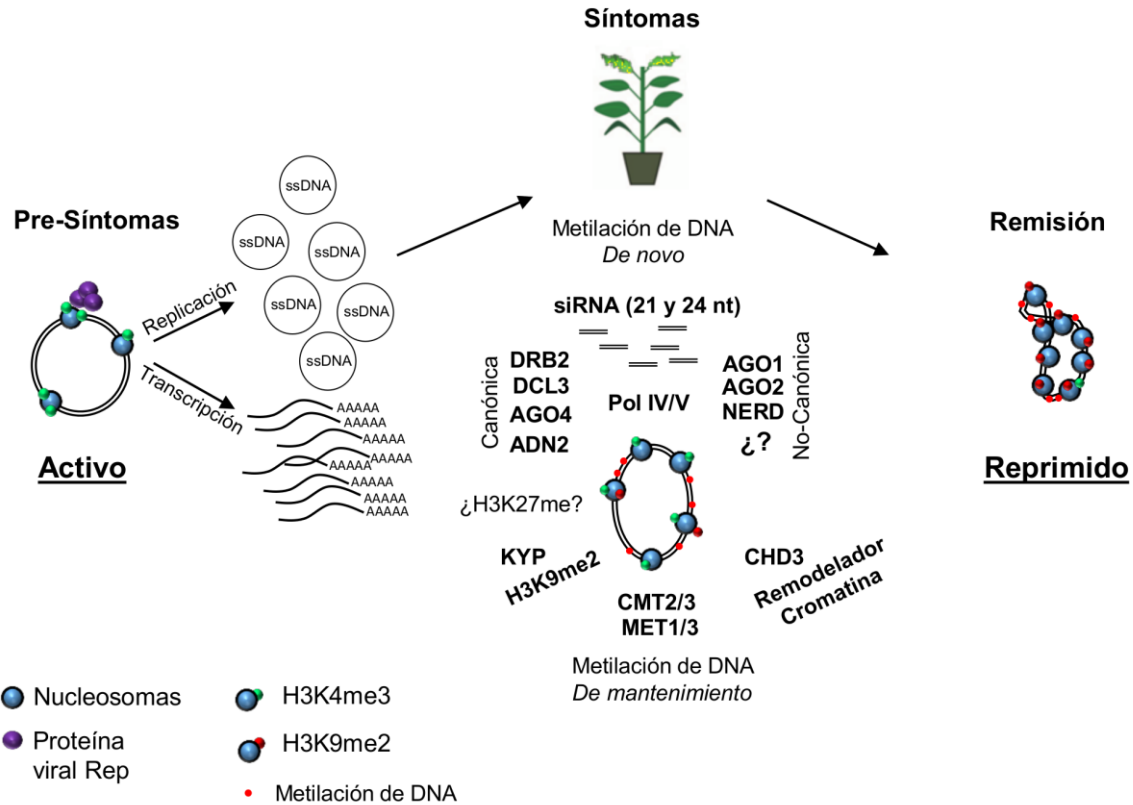


Figura 22. Modelo Propuesto para explicar la actividad del minicromosoma viral (MCV) de PepGMV durante su ciclo infeccioso en *Capsicum annuum*. El minicromosoma viral (MCV) que se encuentra en tejido pre-sintomático se encuentra con una estructura relajada (bajo número de nucleosomas), alcanzando su máxima tasa de replicación y transcripción viral, provocando con ello, los síntomas característicos de la infección. Este ritmo de actividad viral, desata la respuesta de defensa y la planta despliega la maquinaria de silenciamiento génico contra el virus. Primero, se generan siRNAs de 21 y 24 nucleótidos. Estos siRNAs sirven de guía para la metilación *de novo* del DNA viral. Esta metilación del DNA viral puede establecerse por dos posibles vías; la ruta canónica (siRNA24nt/DCL3/AGO4/ADN2/*RDR2/DRM2*) o por la ruta no-canónica (AGO1/AGO2/NERD/*RDR6/DCL2/DCL4*), y mantenerse por las DNA metiltransferasas CMT 2/3 y MET1/3. El MCV es hipermetilado, la metiltransferasa de histonas KYP (SUV4) establece las modificaciones H3K9me2. El remodelador de la cromatina CHD3 reconoce las marcas H3K9me2, se une al MCV y deposita nucleosomas, lo que tiene como resultado un MCV condensando y reprimido. Esta represión del MCV es lo que conlleva a una recuperación o remisión de síntomas. Las proteínas que están señaladas en cursivas y subrayadas no fueron encontradas en el análisis proteómico, pero se sabe que son necesarias para que los mecanismos se lleven a cabo.

VII. Conclusión

El minicromosoma viral (MCV), al estar dentro del núcleo y rodeado por toda la maquinaria celular, es afectado por diversos procesos epigenéticos y éstos dan como resultado al menos dos diferentes poblaciones de minicromosoma viral. Estas poblaciones están basadas en la estructura cromática que el minicromosoma adopta en los estadios de síntomas y remisión.

En este trabajo pudimos coleccionar evidencia que sugiere que en el estadio de síntomas, la maquinaria de silenciamiento génico del hospedero se encuentra desplegada y está actuando sobre el MCV, por lo tanto la actividad viral en esa etapa ya va en declive. A diferencia de lo que se pensaba antes, que era en la etapa de síntomas donde el virus alcanzaba su máxima actividad, nosotros proponemos que es en el estadio denominado Pre-Síntomas donde esto ocurre. Es posible que la alta tasa de replicación y transcripción de PepGMV en Pre-síntomas, detone el mecanismo de silenciamiento génico del hospedero (PTGS y TGS).

VIII. Perspectivas

Considerando los resultados presentados en este trabajo, algunas alternativas para continuar el estudio serían las siguientes:

Realizar la cinética de la replicación viral en diferentes tiempos durante el ciclo infectivo, para determinar la etapa de máxima actividad viral.

Establecer si el cccDNA viral obtenido de tejido en remisión (que como hemos determinado en este estudio se encuentra hipermetilado), es capaz de generar los síntomas con la misma severidad y temporalidad cuando es inoculado en plantas sanas. Este dato nos daría evidencia directa sobre el papel que desempeña la metilación del DNA viral en la infección.

Realizar el mapeo del posicionamiento de nucleosomas dentro del minicromosoma viral, esto daría evidencia directa y contundente sobre la estructura del minicromosoma, además del papel que desempeña en los mecanismos de replicación y transcripción viral.

Continuar con la extracción de histonas (Anexo; Figuras 1 y 2), y realizar el perfil global de las modificaciones post-traduccionales de histonas del minicromosoma viral en los estadios de Pre-síntomas, Síntomas y Remisión.

Analizar sí la modificación post-traducciona H3K4me3 puede ser una pieza clave para facilitar la entrada de la proteína viral Rep al minicromosoma y con ello dar inicio a la replicación viral.

IX. Referencias

- Abouzid, A., Frischmuth, T., & Jeske, H. (1988). A putative replicative form of the Abutilon mosaic virus (gemini group) in a chromatin-like structure. *Molecular and General Genetics* ..., (1988), 252–258.
- Adomas, A., & Wade, P. (2013). Chromatin Structure and Gene Expression: Function Follows Form. In *Environmental Epigenomics in Health and Disease* (pp. 297–308). <http://doi.org/10.1007/978-3-642-23380-7>
- Akbergenov, R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, C., Vanderschuren, H., ... Pooggin, M. M. (2006). Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 462–71. <http://doi.org/10.1093/nar/gkj447>
- Akhtar, A., Becker, P. B., Gene, T., Programme, E., & Butenandt-institut, A. (2000). Activation of Transcription through Histone H4 Acetylation by MOF , an Acetyltransferase Essential for Dosage Compensation in Drosophila. *Molecular Cell*, 5, 367–375.
- Allshire, R. C., & Karpen, G. H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nature Reviews. Genetics*, 9(12), 923–937. <http://doi.org/10.1038/nrg2466>
- Altaf, M., Auger, A., Covic, M., & Côté, J. (2009). Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 87(1), 35–50. <http://doi.org/10.1139/O08-140>
- Arbuckle, J. H., & Kristie, T. M. (2014). Epigenetic Repression of Herpes Simplex Virus Infection by the Nucleosome Remodeler CHD3. *MBio*, 5(1), 16–18. <http://doi.org/10.1128/mBio.01027-13>.Editor
- Ascencio-Ibáñez, J. T., Sozzani, R., Lee, T.-J., Chu, T.-M., Wolfinger, R. D., Cella, R., & Hanley-Bowdoin, L. (2008). Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology*, 148(1), 436–454. <http://doi.org/10.1104/pp.108.121038>
- Baarends, W. M., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., Schoenmakers, S., Sun, Z.-W., & Grootegeod, J. A. (2007). Increased phosphorylation and dimethylation of XY body histones in the Hr6b-knockout mouse is associated with derepression of the X chromosome. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 11), 1841–51. <http://doi.org/10.1242/jcs.03451>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–95. <http://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barber, C. M., Turner, F. B., Wang, Y., Hagstrom, K., Taverna, S. D., Mollah, S., ... Allis, C. D. (2004). The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma*, 112(7), 360–371. <http://doi.org/10.1007/s00412-004-0281-9>
- Bauer, U. M., Daujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, K., & Kouzarides, T. (2002). Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Reports*, 3(1), 39–44. <http://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf013>
- Bellard, M., Oudet, P., Germond, J. E., & Chambon, P. (1976). Subunit structure of simian-virus-40 minichromosome. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 70(2), 543–53. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb11046.x>
- Belloni, L., Pollicino, T., De Nicola, F., Guerrieri, F., Raffa, G., Fanciulli, M., ... Levrero, M. (2009).

- Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), 19975–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0908365106>
- Bian, X.-Y., Rasheed, M. S., Seemanpillai, M. J., & Ali Rezaian, M. (2006). Analysis of silencing escape of tomato leaf curl virus: an evaluation of the role of DNA methylation. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 19(6), 614–24. <http://doi.org/10.1094/MPMI-19-0614>
- Birchler, J. A. (2015). Engineered minichromosomes in plants. *Chromosome Research*, 23(1), 77–85. <http://doi.org/10.1007/s10577-014-9454-4>
- Birger, B., & Schneider, R. (2014). Histone variants: Key players of chromatin. *Cell and Tissue Research*, 356(3), 457–466. <http://doi.org/10.1007/s00441-014-1862-4>
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.-S., ... Pooggin, M. M. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6233–46. <http://doi.org/10.1093/nar/gkl886>
- Bock, C. T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M. P., Trautwein, C., & Zentgraf, H. (2001). Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol*, 307(1), 183–196. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4481>
- Boettiger, A. N., Bintu, B., Moffitt, J. R., Wang, S., Beliveau, B. J., Fudenberg, G., ... Zhuang, X. (2016). Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states. *Nature*, 529, 418–422. <http://doi.org/10.1038/nature16496>
- Bond, D. M., & Baulcombe, D. C. (2015). Epigenetic transitions leading to heritable, RNA-mediated de novo silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), 917–922. <http://doi.org/10.1073/pnas.1413053112>
- Boyer, S. N., Wazer, D. E., & Band, V. (1996). E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway Advances in Brief E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Prot, (8), 4620–4624.
- Burman, B., Zhang, Z. Z., Pegoraro, G., Lieb, J. D., & Misteli, T. (2015). Histone modifications predispose genome regions to breakage and translocation. *Genes & Development*, 1–10. <http://doi.org/10.1101/gad.262170.115.GENES>
- Camacho, J. P. M. (2004). *B Chromosomes in the Eukariote Genomes*.
- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F., & Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1394), 163–178. <http://doi.org/10.1098/rstb.2000.0556>
- Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E., & Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 97(1), 51–59.
- Castillo-González, C., Liu, X., Huang, C., Zhao, C., Ma, Z., Hu, T., ... Zhang, X. (2015). Geminivirus-encoded TrAP suppressor inhibits the histone methyltransferase SUVH4/KYP to counter host defense. *eLife*, 4(September), 1–31. <http://doi.org/10.7554/eLife.06671>
- Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, 10(5), 295–304. <http://doi.org/10.1038/nrg2540>
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Pita, J., & Fauquet, C. M. (2004). Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific

- viral sequences. *Journal of Virology*, 78(14), 7465–7477.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S., Schurter, B. T., ... Stallcup, M. R. (1999). Regulation of Transcription by a Protein Methyltransferase. *Science*, 284(June), 2174–2177. <http://doi.org/10.1126/science.284.5423.2174>
- Cheung, W. L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C. A., ... Allis, C. D. (2003). Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*, 113(4), 507–517. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00355-6](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00355-6)
- Chodavarapu, R. K., Feng, S., Bernatavichute, Y. V, Chen, P.-Y., Stroud, H., Yu, Y., ... Pellegrini, M. (2010). Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature*, 466(7304), 388–92. <http://doi.org/10.1038/nature09147>
- Cliffe, A. R., Garber, D. a, & Knipe, D. M. (2009). Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *Journal of Virology*, 83(16), 8182–8190. <http://doi.org/10.1128/JVI.00712-09>
- Cliffe, A. R., & Knipe, D. M. (2008). Herpes simplex virus ICP0 promotes both histone removal and acetylation on viral DNA during lytic infection. *Journal of Virology*, 82(24), 12030–8. <http://doi.org/10.1128/JVI.01575-08>
- Conaway, J. W. (2012). Introduction to Theme “Chromatin, Epigenetics, and Transcription .” *Annual Review of Biochemistry*, (February), 19–22. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-090711-093103>
- Cremisi, C., Pignatti, P. F., Croissant, O., & Yaniv, M. (1975). Chromatin-like structures in polyoma virus and simian virus 10 lytic cycle. *Journal of Virology*, 17(1), 204–211.
- Cutter, A. R., & Hayes, J. J. (2015). A brief review of nucleosomes structure. *FEBS Letters*, 589(20), 2914–2922.
- Deshmane, S., & Fraser, N. (1989). During Latency, Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Is Associated with Nucleosomes in a Chromatin Structure. *Journal of Virology*, 46(2), 943–447.
- Du, J., Johnson, L. M., Groth, M., Feng, S., Hale, C. J., Li, S., ... Jacobsen, S. E. (2014). Mechanism of DNA methylation-directed histone methylation by KRYPTONITE. *Molecular Cell*, 55(3), 495–504. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.009>
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., & Patel, D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Publishing Group*, 16(9), 519–532. <http://doi.org/10.1038/nrm4043>
- Feng, S., Cokus, S. J., Zhang, X., Chen, P.-Y., Bostick, M., Goll, M. G., ... Jacobsen, S. E. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8689–8694. <http://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>
- Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: Teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(5 SPEC. ISS.), 490–495. <http://doi.org/10.1016/j.gde.2005.08.002>
- FUSAUCHI, Y., & Koichi, I. W. A. I. (1984). Tetrahymena histone H2A. Acetylation in the N-terminal sequence and phosphorylation in the C-terminal sequence. *Journal of Biochemistry*, 95(1), 147–154.
- Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N. P., & Bickmore, W. a. (2004). Chromatin architecture of the human genome: Gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers.

- Cell*, 118(5), 555–566. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.011>
- Giresi, P. G., Kim, J., Mcdaniell, R. M., Giresi, P. G., Kim, J., Mcdaniell, R. M., ... Lieb, J. D. (2007). FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Research*, 17, 877–885. <http://doi.org/10.1101/gr.5533506>
- Golebiowski, F., & Kasprzak, K. S. (2005). Inhibition of core histones acetylation by carcinogenic nickel(II). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 279(1-2), 133–139. <http://doi.org/10.1007/s11010-005-8285-1>
- Golem, S., & Culver, J. N. (2003). Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 16(8), 681–688.
- Góngora-Castillo, E., Ibarra-Laclette, E., Trejo-Saavedra, D. L., & Rivera-Bustamante, R. F. (2012). Transcriptome analysis of symptomatic and recovered leaves of geminivirus-infected pepper (*Capsicum annuum*). *Virology Journal*, 9, 295. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-9-295>
- Goyal, A., Bhowmik, P. K., & Basu, S. K. (2009). Minichromosomes : The second generation genetic engineering tool. *Plant Omics Journal*, 2(1), 1–8.
- Gruntman, E., Qi, Y., Slotkin, R. K., Roeder, T., Martienssen, R. a, & Sachidanandam, R. (2008). Kismeth: analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. *BMC Bioinformatics*, 9, 371. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-9-371>
- Guo, X. W., & Cole, R. D. (1989). Chromatin aggregation changes substantially as pH varies within the physiological range. *Journal of Biological Chemistry*, 264(20), 11653–11657.
- Gutzat, R., Borghi, L., Fütterer, J., Bischof, S., Laizet, Y., Hennig, L., ... Gruissem, W. (2011). RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN controls the transition to autotrophic plant development. *Development (Cambridge, England)*, 138(14), 2977–86. <http://doi.org/10.1242/dev.060830>
- Hamilton, A., & Baulcombe, D. (1999). A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science*, 286(5441), 950–952. <http://doi.org/10.1126/science.286.5441.950>
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal*, 21(17), 4671–9.
- Hanley-Bowdoin, JS Elmer, S. R. (1989). Functional expression of the leftward open reading frames of the A component of tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell ...*, 1(11), 1057–1067.
- Hanley-Bowdoin, L. (2004). Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular Plant ...*, 5, 149–156. <http://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00214.X>
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(11), 777–88. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3117>
- Hehnle, S., Wege, C., & Jeske, H. (2004). Interaction of DNA with the movement proteins of geminiviruses revisited. *Journal of Virology*, 78(14), 7698–7706. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7698>
- Holmes, D. S., & Bougourd, S. M. (1991). B-chromosome selection in *Aium schoenoprasum* II . Experimental populations. *Heredity*, 67(October 1990), 117–122.

- Houben, A., Banaei-Moghaddam, A. M., Klemme, S., & Timmis, J. N. (2014). Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3), 467–478. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1437-7>
- J. Griffith. (1975). Chromatin Structure: Deduced from a Minichromosome. *Science*, 187(4182), 1202–1203.
- Jeske, H., Lütgemeier, M., & Preiß, W. (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal*, 20(21), 6158–6167. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6158>
- Jones, N., & Houben, A. (2003). B chromosomes in plants: Escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science*, 8(9), 417–423. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00187-0](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00187-0)
- Jones, P. a. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484–492. <http://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Kamakaka, R. T., & Thomas, J. O. (1990). Chromatin structure of transcriptionally competent and repressed genes. *The EMBO Journal*, 9(12), 3997–4006.
- Kashiwagi, K., Nimura, K., Ura, K., & Kaneda, Y. (2011). DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin. *Nucleic Acids Research*, 39(3), 874–888. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq870>
- Kim, M. Y., & Zilberman, D. (2014). DNA methylation as a system of plant genomic immunity. *Trends in Plant Science*, 19(5), 320–326.
- Kittlmann, K., & Jeske, H. (2008). Disassembly of African cassava mosaic virus. *Journal of General Virology*, 89(8), 2029–2036. <http://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000687-0>
- Knight, J. S., Sharma, N., & Robertson, E. S. (2005). Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18562–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0503886102>
- Kong, L. J., Orozco, B. M., Roe, J. L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H. S., ... Hanley-Bowdoin, L. (2000). A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *The EMBO Journal*, 19(13), 3485–3495. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3485>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Lacasse, J. J., & Schang, L. M. (2012). Herpes simplex virus 1 DNA is in unstable nucleosomes throughout the lytic infection cycle, and the instability of the nucleosomes is independent of DNA replication. *Journal of Virology*, 86(20), 11287–300. <http://doi.org/10.1128/JVI.01468-12>
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S. G., Schell, J., & Gronenborn, B. (1995). In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3879–3883. <http://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3879>
- Law, J. a, & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews. Genetics*, 11(3), 204–220. <http://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications

- Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics*, 32(1), 42–56. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- Leach, C. R., Houben, A., Field, B., Pistrick, K., Demidov, D., & Timmis, J. N. (2005). Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics*, 171(1), 269–278. <http://doi.org/10.1534/genetics.105.043273>
- Lee, J. S., Raja, P., & Knipe, M. (2016). Herpesviral ICP0 Protein Promotes Two Waves of Heterochromatin. *MBio*, 7(9), 1–11. <http://doi.org/10.1128/mBio.02007-15.Editor>
- Leverero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., & Dandri, M. (2009). Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 51(3), 581–592. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022>
- Li, Q., Gent, J. I., Zynda, G., Song, J., Makarevitch, I., Hirsch, C. D., ... Springer, N. M. (2015). RNA-directed DNA methylation enforces boundaries between heterochromatin and euchromatin in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1514680112>
- Lieber, M. R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 181–211. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Lu, X., Simon, M. D., Chodaparambil, J. V, Hansen, J. C., Shokat, K. M., & Luger, K. (2008). The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(10), 1122–1124. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1489>
- Luger, K., Dechassa, M. L., & Tremethick, D. J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(7), 436–47. <http://doi.org/10.1038/nrm3382>
- Luger, K., Mäder, A., & Richmond, R. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 7, 251–260.
- M.J. Adams, A.M.Q. King, E. B. C. (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Archives of Virology*, 158(7), 2023–2030. <http://doi.org/10.1007/s00705-013-1688-5>
- MacAlpine, D. M., & Almouzni, G. (2013). Chromatin and DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8), a010207. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a010207>
- Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, 15(6), 394–408. <http://doi.org/10.1038/nrg3683>
- Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M., & Rivera-Bustamante, R. F. (2003). Interactions Between Geminiviruses in a Naturally Occurring Mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 93(3), 270–277. <http://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.270>
- Menissier, J., Murcia, G. De, Lebeurier, G., & Hirth, L. (1983). Electron microscopic studies of the different topological forms of the cauliflower mosaic virus DNA: knotted encapsidated DNA and nuclear minichromosome. *The EMBO Journal*, 2(7), 1067–1071.
- Mi, H., Lazareva-Ulitsky, B., Loo, R., Kejariwal, A., Vandergriff, J., Rabkin, S., ... Thomas, P. D. (2005). The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Research*, 33(DATABASE ISS.), 284–288. <http://doi.org/10.1093/nar/gki078>

- Mochizuki, T., Ogata, Y., Hirata, Y., & Ohki, S. T. (2014). Quantitative transcriptional changes associated with chlorosis severity in mosaic leaves of tobacco plants infected with cucumber mosaic virus. *Molecular Plant Pathology*, *15*(3), 242–254. <http://doi.org/10.1111/mpp.12081>
- Murata, M. (2014). Minichromosomes and artificial chromosomes in Arabidopsis. *Chromosome Research*, *22*(2), 167–178. <http://doi.org/10.1007/s10577-014-9421-0>
- Nalabothula, N., McVicker, G., Maiorano, J., Martin, R., Pritchard, J. K., & Fondufe-Mittendorf, Y. N. (2014). The chromatin architectural proteins HMGD1 and H1 bind reciprocally and have opposite effects on chromatin structure and gene regulation. *BMC Genomics*, *15*(1), 92. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-92>
- Nevels, M., & Nitzsche, A. (2011). How to control an infectious bead string: nucleosome-based regulation and targeting of herpesvirus chromatin. *Reviews in Medical Virology*, 154–180. <http://doi.org/10.1002/rmv>
- Newbold, J. E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S., & Locarnini, S. (1995). The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *Journal of Virology*, *69*(6), 3350–3357. <http://doi.org/PMC189047>
- Nishioka, K., Rice, J. C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., ... Reinberg, D. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent Chromatin. *Molecular Cell*, *9*(6), 1201–1213. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00548-8](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00548-8)
- Noeiry, A. O., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, *76*(5), 925–932.
- Olszewski, N., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1982). A transcriptionally active, covalently closed minichromosome of cauliflower mosaic virus DNA isolated from infected turnip leaves. *Cell*, *29*(2), 395–402.
- Orozco, B. M., & Hanley-Bowdoin, L. (1996). A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology*, *70*(1), 148–58.
- Orsi, G. A., Couble, P., & Loppin, B. (2009). Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. *International Journal of Developmental Biology*, *53*(2-3), 231–243. <http://doi.org/10.1387/ijdb.082653go>
- Paprotka, T., Deuschle, K., Metzler, V., & Jeske, H. (2011). Conformation-Selective Methylation of Geminivirus DNA. *Journal of Virology*, *85*(22), 12001–12012. <http://doi.org/10.1128/JVI.05567-11>
- Paprotka, T., Deuschle, K., Pilartz, M., & Jeske, H. (2015). Form follows function in geminiviral minichromosome architecture. *Virus Research*, *196*, 44–55. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.004>
- Park, H. K., Min, B. Y., Kim, N. Y., Jang, E. S., Shin, C. M., Park, Y. S., ... Kim, J. W. (2013). Short hairpin RNA induces methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in human hepatoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *436*(2), 152–155. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.108>
- Park, J., Lee, H.-J., Cheon, C.-I., Kim, S.-H., Hur, Y.-S., Auh, C.-K., ... Davis, K. R. (2011). The Arabidopsis thaliana homeobox gene ATHB12 is involved in symptom development caused by geminivirus infection. *PLoS One*, *6*(5), e20054. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020054>
- Pascal, E., Sanderfoot, A., Ward, B. M., Medville, R., Turgeon, R., & Lazarowitz, S. G. (1994). The

- Geminivirus BRI Movement Protein Binds Single-Stranded DNA and Localizes to the Cell Nucleus, 6(July), 995–1006.
- Pasumarthy, K. K., Choudhury, N. R., & Mukherjee, S. K. (2010). Tomato leaf curl Kerala virus (ToLCKeV) AC3 protein forms a higher order oligomer and enhances ATPase activity of replication initiator protein (Rep/AC1). *Virology Journal*, 7, 128. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-7-128>
- Pepenella, S., Murphy, K. J., & Hayes, J. J. (2014). Intra- and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure. *Chromosoma*, 123(1-2), 3–13. <http://doi.org/10.1007/s00412-013-0435-8>
- Pignattii, P. F., & Cassai, E. (1980). Analysis of Herpes Simplex Virus Nucleoprotein Complexes Extracted from Infected Cells. *Journal of Virology*, 36(3), 816–828.
- Pilartz, M., & Jeske, H. (1992). Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology*, 189(2), 800–2.
- Pilartz, M., & Jeske, H. (2003). Mapping of abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *Journal of Virology*, 77(20), 10808–10818. <http://doi.org/10.1128/JVI.77.20.10808-10818.2003>
- Pollicino, T., Belloni, L., Raffa, G., Pediconi, N., Squadrito, G., Raimondo, G., & Levrero, M. (2006). Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*, 130(3), 823–837. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.001>
- Pooggin, M. M. (2013). How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 15233–15259. <http://doi.org/10.3390/ijms140815233>
- Pooggin, M., Shivaprasad, P. V., Veluthambi, K., & Hohn, T. (2003). RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nature Biotechnology*, 21(2), 131–132. <http://doi.org/10.1038/nbt0203-131b>
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J., & Hannon, G. J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443(7114), 1008–1012. <http://doi.org/10.1038/nature05198>
- Raja, P., Jackel, J. N., Li, S., Heard, I. M., & Bisaro, D. M. (2013). Arabidopsis Double-Stranded RNA Binding Protein DRB3 Participates in Methylation-Mediated Defense against Geminiviruses. *Journal of Virology*, 88(5), 2611–22. <http://doi.org/10.1128/JVI.02305-13>
- Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C., & Bisaro, D. M. (2008). Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *Journal of Virology*, 82(18), 8997–9007. <http://doi.org/10.1128/JVI.00719-08>
- Raja, P., Wolf, J. N., & Bisaro, D. M. (2010). RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(3-4), 337–351. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.01.004>
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., ... Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), 593–9. <http://doi.org/10.1038/35020506>
- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., & Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal*, 8(1), 104. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-104>
- Richmond, T. J., & Davey, C. a. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*,

- 423(6936), 145–50. <http://doi.org/10.1038/nature01595>
- Rivera-Bustamante, R. F., & Semancik, J. (1989). Properties of a viroid-replicating complex solubilized from nuclei. *Journal of General Virology*, 70, 2707–2716.
- Rivière, L., Gerossier, L., Ducroux, A., Dion, S., Deng, Q., Michel, M.-L., ... Neuveut, C. (2015). HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *Journal of Hepatology*. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.023>
- Robzyk, K., Recht, J., & Osley, M. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science (New York, NY)*, 287(5452), 501–504. <http://doi.org/10.1126/science.287.5452.501>
- Rodríguez-Negrete, E. A., Sánchez-Campos, S., Cañizares, M. C., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Bejarano, E. R., & Grande-Pérez, A. (2014). A sensitive method for the quantification of virion-sense and complementary-sense DNA strands of circular single-stranded DNA viruses. *Scientific Reports*, 4.
- Rodríguez-Negrete, E. a, Carrillo-Tripp, J., & Rivera-Bustamante, R. F. (2009). RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of Virology*, 83(3), 1332–40. <http://doi.org/10.1128/JVI.01474-08>
- Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W. W. M. P., Wilm, M., Aasland, R., & Stewart, A. F. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO Journal*, 20(24), 7137–7148. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7137>
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 361–394. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>
- Rojas, M. R., Noueiry, A. O., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, 95(1), 105–113. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81786-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81786-9)
- Rosa, S., & Shaw, P. (2013). Insights into chromatin structure and dynamics in plants. *Biology*, 2(4), 1378–410. <http://doi.org/10.3390/biology2041378>
- Russo, M., Cohen, S., & Martelli, G. P. (1980). Virus-like particles in tomato plants affected by the yellow leaf curl disease. *Journal of General Virology*, 49(1), 209–213. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-49-1-209>
- Saleh, A., Alvarez-Venegas, R., & Avramova, Z. (2008). An efficient chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol for studying histone modifications in Arabidopsis plants. *Nature Protocols*, 3(6), 1018–1025.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C. T., ... Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419(6905), 407–411. <http://doi.org/10.1038/nature01071>. Published
- Seemanpillai, M., Dry, I., Randles, J., & Rezaian, A. (2003). Transcriptional silencing of geminiviral promoter-driven transgenes following homologous virus infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 16(5), 429–38. <http://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.5.429>
- Settlage, S., See, R., & Hanley-Bowdoin, L. (2005). Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions. *Journal of Virology*, 79(15), 9885–9895. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9885>

- Sheinin, M. Y., Li, M., Soltani, M., Luger, K., & Wang, M. D. (2013). Torque modulates nucleosome stability and facilitates H2A/H2B dimer loss. *Nature Communications*, 4, 2579. <http://doi.org/10.1038/ncomms3579>
- Shi, L., Li, S., Shen, F., Li, H., Qian, S., Lee, D. H. S., ... Yang, W. (2012). Characterization of Nucleosome Positioning in Hepadnaviral Covalently Closed Circular DNA Minichromosomes. *Journal of Virology*, 86(18), 10059–10069. <http://doi.org/10.1128/JVI.00535-12>
- Shimada-Beltrán, H., & Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Early and late gene expression in pepper huasteco yellow vein virus. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 11), 3145–53. <http://doi.org/10.1099/vir.0.83003-0>
- Shung, C.-Y., & Sunter, G. (2009). Regulation of Tomato golden mosaic virus AL2 and AL3 gene expression by a conserved upstream open reading frame. *Virology*, 383(2), 310–8. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.020>
- Shung, C.-Y., Sunter, J., Sirasanagandla, S. S., & Sunter, G. (2006). Distinct viral sequence elements are necessary for expression of Tomato golden mosaic virus complementary sense transcripts that direct AL2 and AL3 gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1394–1405. <http://doi.org/10.1094/MPMI-19-1394> [doi]
- Sigman, M. J., & Slotkin, R. K. (2016). The First Rule of Plant Transposable Element Silencing: Location, Location, Location. *The Plant Cell*, 28(February), 304–313. <http://doi.org/10.1105/tpc.15.00869>
- Sogo, J. M., Stahl, H., Koller, T., & Knippers, R. (1986). Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 189–204. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90390-6](http://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90390-6)
- Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C., & Bisaro, D. M. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Pnas*, 88(18), 8029–8033. <http://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8029>
- Sterner, D. E., & Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(2), 435–459. <http://doi.org/10.1128/MMBR.64.2.435-459.2000>
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45. <http://doi.org/10.1038/47412>
- Strahl, B. D., Ohba, R., Cook, R. G., & Allis, C. D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96(16), 14967–14972.
- Su, R. T., DePamphilis, M. L., Sut, R. T., & DePamphilis, M. L. (1978). Simian virus 40 DNA replication in isolated replicating viral chromosomes. *Journal of Virology*, 28(1), 53–65.
- Suka, N., Suka, Y., Carmen, A. A., Wu, J., Grunstein, M., Hall, B., & East, Y. D. (2001). Technique Histone Acetylation Site Usage in Yeast Heterochromatin and Euchromatin. *Molecular Cell*, 8, 473–479.
- Sun, Y.-W., Tee, C.-S., Ma, Y.-H., Wang, G., Yao, X.-M., & Ye, J. (2015). Attenuation of Histone Methyltransferase KRYPTONITE-mediated transcriptional gene silencing by Geminivirus. *Scientific Reports*, 5(October), 16476. <http://doi.org/10.1038/srep16476>
- Swygert, S. G., & Peterson, C. L. (2014). Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(8), 728–736. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.013>

- Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., ... Kurumizaka, H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10454–10459. <http://doi.org/10.1073/pnas.1003064107>
- Talbert, P. B., & Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(4), 264–75. <http://doi.org/10.1038/nrm2861>
- Taylor, T. J., & Knipe, D. M. (2004). Proteomics of Herpes Simplex Virus Replication Compartments : Association of Cellular DNA Replication , Repair , Recombination , and Chromatin Remodeling Proteins with ICP8 Proteomics of Herpes Simplex Virus Replication Compartments : Association of Cellu. *Journal of Virology*, 78(11), 5856–5866. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5856>
- Tessarz, P., & Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(11), 703–708. <http://doi.org/10.1038/nrm3890>
- Thatcher, T. H., & Gorovsky, M. A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Research*, 22(2), 174–179.
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., ... Narechania, A. (2003). PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research*, 13(9), 2129–2141. <http://doi.org/10.1101/gr.772403>
- Toth, Z., Maglinte, D. T., Lee, S. H., Lee, H. R., Wong, L. Y., Brulois, K. F., ... Jung, J. U. (2010). Epigenetic analysis of KSHV latent and lytic genomes. *PLoS Pathogens*, 6(7), 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001013>
- Trifonov, V. A., Dementyeva, P. V., Larkin, D. M., O'Brien, P. C. M., Perelman, P. L., Yang, F., ... Graphodatsky, A. S. (2013). Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC Biology*, 11(1), 90. <http://doi.org/10.1186/1741-7007-11-90>
- Tu, J., & Sunter, G. (2007). A conserved binding site within the Tomato golden mosaic virus AL-1629 promoter is necessary for expression of viral genes important for pathogenesis. *Virology*, 367(1), 117–125. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.018>
- Turner, B. M. (2008). Simplifying a complex code. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(6), 542–4. <http://doi.org/10.1038/nsmb0608-542>
- Vivekanandan, P., Thomas, D., & Torbenson, M. (2009). Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(9), 1286–1291. <http://doi.org/10.1086/597614>
- Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., ... Zhang, Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), 853–857. <http://doi.org/10.1126/science.1060781>
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., & Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, 431(7010), 862–868. <http://doi.org/10.1038/nature02926>
- Wang, J., Jia, S., & Jia, S. (2016). New Insights into the Regulation of Heterochromatin. *Trends in Genetics*, 159–176. http://doi.org/10.1007/978-94-010-0163-2_7
- Whitham, S. A., Quan, S., Chang, H., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., ... Hou, Y. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants.

- Plant Journal*, 33, 271–283.
- Whittaker, G. R., & Helenius, A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology*, 246(1), 1. <http://doi.org/10.1006/viro.1998.9165>
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C., & Qi, Y. (2010). DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, 38(3), 465–475. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.008>
- Xie, M., & Yu, B. (2015). siRNA-directed DNA Methylation in Plants. *Current Genomics*, 16(1), 23–31. <http://doi.org/10.2174/1389202915666141128002211>
- Yanhai Guo, Yongnian Li, Shijie Mu, Ju Zhang, Z. Y. (2009). Evidence That Methylation of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA in Liver Tissues of Patients With Chronic Hepatitis B Modulates HBV Replication. *Journal of Medical Virology*, 81, 1177–1183. <http://doi.org/10.1002/jmv>
- Yoshida, K., Terai, Y., Mizoiri, S., Aibara, M., Nishihara, H., Watanabe, M., ... Okada, N. (2011). B chromosomes have a functional effect on female sex determination in lake victoria cichlid fishes. *PLoS Genetics*, 7(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002203>
- Young, N. L., DiMaggio, P. a, Plazas-Mayorca, M. D., Baliban, R. C., Floudas, C. a, & Garcia, B. a. (2009). High throughput characterization of combinatorial histone codes. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 8(10), 2266–84. <http://doi.org/10.1074/mcp.M900238-MCP200>
- Young, N. L., DiMaggio, P. A., & Garcia, B. A. (2010). The significance, development and progress of high-throughput combinatorial histone code analysis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(23), 3983–4000. <http://doi.org/10.1007/s00018-010-0475-7>
- Zalckvar, E., Paulus, C., Tillo, D., Asbach-Nitzsche, A., Lubling, Y., Winterling, C., ... Nevels, M. (2013). Nucleosome maps of the human cytomegalovirus genome reveal a temporal switch in chromatin organization linked to a major IE protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), 13126–13131. <http://doi.org/10.1073/pnas.1305548110>
- Zhang, K., Williams, K., Huang, L., Yau, P., Siino, J., Bradbury, E. M., ... Burlingame, A. (2002). Histone Acetylation and Deacetylation Identification of Acetylation and Methylation Sites of HeLa Histone H4 by Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1, 500–508. <http://doi.org/10.1074/mcp.M200031-MCP200>
- Zhang, Y., Mao, R., Yan, R., Cai, D., Zhang, Y., Zhu, H., ... Zhang, J. (2014). Transcription of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Is Regulated by CpG Methylation during Chronic Infection. *PLoS ONE*, 9(10), e110442. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0110442>
- Zhou, Y., Rojas, M. R., Park, M.-R., Seo, Y.-S., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2011). Histone H3 interacts and colocalizes with the nuclear shuttle protein and the movement protein of a geminivirus. *Journal of Virology*, 85(22), 11821–32. <http://doi.org/10.1128/JVI.00082-11>
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R. K., Ballinger, T., & Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39(1), 61–69. <http://doi.org/10.1038/ng1929>

X. ANEXOS

10.1 Purificación e Identificación de Histonas de núcleos de planta de chile.

Extracción de Histonas

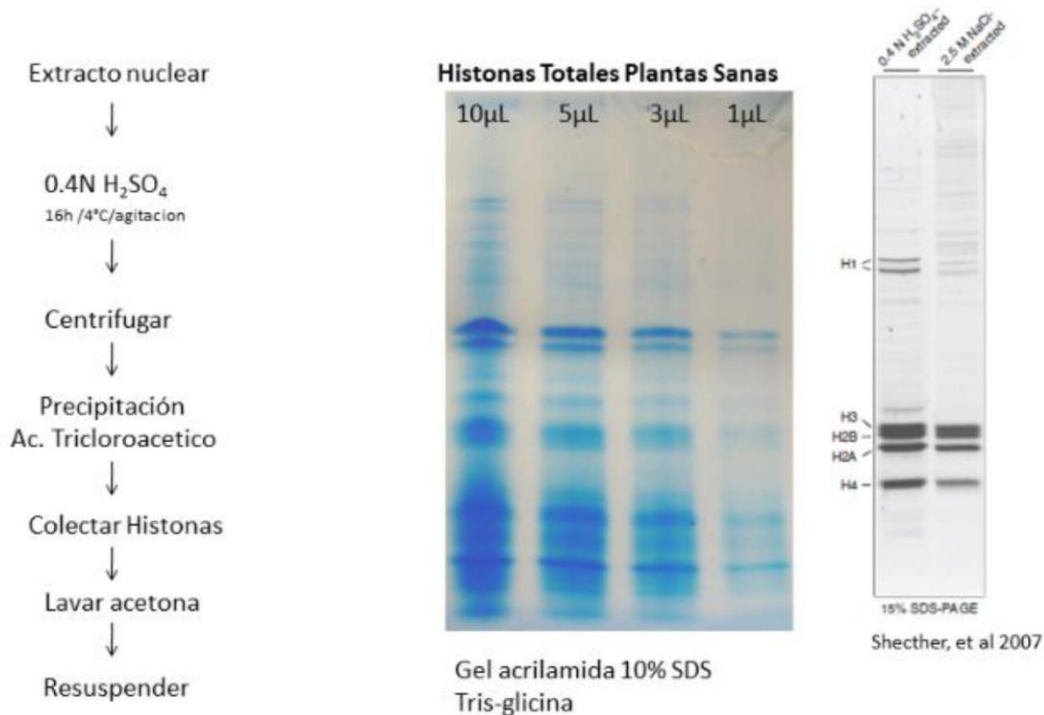


Figura 1. Purificación de histonas partiendo de extracto rico en núcleos de plantas sanas de Chile por el método ácido. Al lado izquierdo aparece el diagrama de flujo del método de extracción resumido. Al centro aparece el gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie, con las diferentes concentraciones de las proteínas obtenidas. Además, podemos observar que las histonas de Chile se enriquecen con este protocolo, cuando lo comparamos con la imagen presentada en la publicación donde se estandariza esta metodología, en la imagen de la derecha se señala la migración de las histonas en el gel.

10.2 Extracción e Identificación de Histonas de Extracto de Sarkosyl de núcleos Sanos e Infectados.

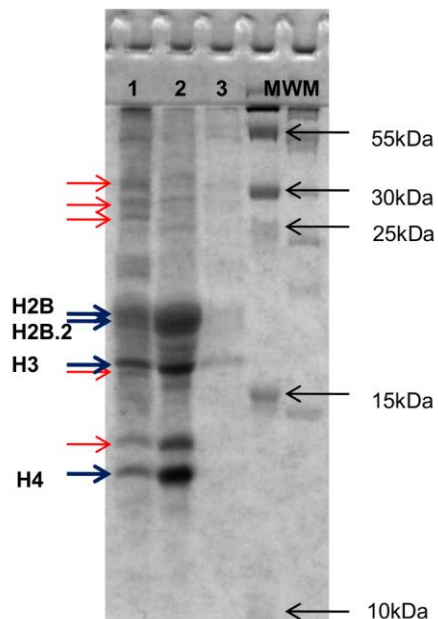


Figura 2. Proteínas aisladas de extracto con Sarkosyl. 1) Control, proteínas purificadas con el método extracción acida. Proteínas obtenidas del extracto de Sarkosyl de núcleos **2)** infectados y **3)** sanos. Las proteínas de las bandas señaladas con flechas fueron cortadas en los carriles 2 y 3, purificadas e identificadas por espectrometría de masas. Las que fueron identificadas se señalan con su nombre y flecha azul. MWM es el marcador de movilidad molecular (kDa).

10.3 Anotación de las proteínas asociadas al minicromosoma en Síntomas y Remisión.

Código	Descripción de la Proteína	Función	# Péptidos	
			S	R
Q6Q1P4	Structural maintenance of chromosomes protein 1	Central component of cohesin, a complex required for chromosome cohesion during the cell cycle.	13	3
Q9SN90	Structural maintenance of chromosomes protein 2-2 OS=Arabidopsis thaliana GN=SMC2-2 PE=2 SV=1	Central component of cohesin, a complex required for chromosome cohesion during the cell cycle.	5	23
Q84ND9	DNA polymerase I B, chloroplasmic/mitochondrial	DNA repair or DNA replication	4	14
F4I735	ARM repeat superfamily protein	Establishment of Sister Chromatid Cohesion	7	17
F4J7T1	Helicase/SANT-associated, DNA binding protein	Helicase	8	4
Q9LKZ3	Retinoblastoma-related protein 1	Key regulator of entry into cell division.	6	11
Q588V7	Helicase and polymerase-containing protein TEBICHI OS=Arabidopsis thaliana GN=TEB PE=2 SV=1	Regulates the progression of cell cycle and DNA replication (e.g. G2/M progression and intrachromosomal recombination) and the expression of genes during development, especially genes nearby the Helitron transposons.	16	43
Q501D5	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein OS=Arabidopsis thaliana GN=ETG1 PE=1 SV=1	Required for sister chromatid cohesion	4	27
F4I096	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13 OS=Arabidopsis thaliana GN=MED13 PE=1 SV=1	Coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes	2	9
Q5XVF0	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit B OS=Arabidopsis thaliana GN=MEE12 PE=1 SV=1	Component of RNA polymerase I core factor complex	3	3
O81098	DNA-directed RNA polymerases II and IV subunit 5A OS=Arabidopsis thaliana GN=NRPB5A PE=1 SV=1	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA	6	21
Q9LTJ8	Methyl-CpG-binding domain-containing protein 13 OS=Arabidopsis thaliana GN=MBD13 PE=2 SV=1	Probable transcriptional regulator.	10	5
Q8LG33	MYB-family transcription factor, putative	Regulation of Transcription	10	26
Q9LXA7	Transcription factor GTE2 OS=Arabidopsis thaliana GN=GTE2 PE=2 SV=2	Regulation of Transcription	5	18

Q700D8	At3g10000 OS=Arabidopsis thaliana GN=EDA31 PE=2 SV=1	Transcription factor	8	4
Q6LA43	Two-component response regulator-like APRR2 OS=Arabidopsis thaliana GN=APRR2 PE=2 SV=2	Transcriptional activator that binds specifically to the DNA sequence 5'-[AG]GATT-3'	5	11
Q9LW00	Methyl-CpG-binding domain-containing protein 11 OS=Arabidopsis thaliana GN=MBD11 PE=1 SV=1	Transcriptional regulator that binds DNA	4	6
F4KBP5	Protein CHROMATIN REMODELING 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=CHR4 PE=2 SV=1	Chromatin-remodeling protein that binds DNA through histones and regulates gene transcription. May specifically recognize and bind trimethylated 'Lys-27'	4	11
F4JW79	Kow domain-containing transcription factor 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=KTF1 PE=1 SV=1	Effector of RNA-directed DNA methylation (RdDM) triggered by small interfering RNAs (siRNAs, 24-nt RNAs).	29	19
Q8GUI6	Probable lysine-specific demethylase JMJ14 OS=Arabidopsis thaliana GN=JMJ14 PE=1 SV=1	Histone demethylase that demethylates H3K4	17	18
O82175	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH5 OS=Arabidopsis thaliana GN=SUVH5 PE=1 SV=1	Histone methyltransferase H3K9	12	3
Q944R7	Protein arginine N-methyltransferase 1.6 OS=Arabidopsis thaliana GN=PRMT16 PE=2 SV=2	Histone-arginine N-methyltransferase activity	4	7
Q5D869	DNA-directed RNA polymerase V subunit 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=NRPE1 PE=1 SV=1	involved in RNA-directed DNA methylation-dependent (RdDM) silencing	6	5
Q9SHF3	Protein argonaute 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=AGO2 PE=1 SV=1	Involved in RNA-mediated post-transcriptional gene silencing (PTGS).	1	4
Q8VXV7	Lysine-specific histone demethylase 1 homolog 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=LDL1 PE=1 SV=1	Probable histone demethylase that reduces the levels of histone H3 'Lys-4' methylation in chromatin	6	3
Q9LID0	Lysine-specific histone demethylase 1 homolog 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=LDL2 PE=2 SV=1	Probable histone demethylase that reduces the levels of histone H3 'Lys-4' methylation in chromatin	3	14
O82189	Probable RNA-dependent RNA polymerase 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=RDR4 PE=3 SV=2	Probably involved in the RNA silencing pathway and required for the generation of small interfering RNAs (siRNAs)	4	3
O82190	Probable RNA-dependent RNA polymerase 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=RDR3 PE=3 SV=2	Probably involved in the RNA silencing pathway and required for the generation of small interfering RNAs (siRNAs)	16	18
Q8VZ79	Protein INVOLVED IN DE NOVO 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=IDN2 PE=1 SV=1	Required for de novo DNA methylation, siRNA accumulation and siRNA-mediated maintenance methylation	2	21
O82504	RNA-dependent RNA polymerase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=RDR2 PE=1 SV=1	RNA-dependent direct polymerase involved in the production of small interfering RNAs (siRNAs). Required	8	17

		for the biogenesis of endogenous siRNAs of 24 nucleotide		
Q9ZVD5	Protein argonaute 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=AGO4 PE=1 SV=2	Together with RDM3, required for transcriptional gene silencing (TGS) by DNA methylation and repressive histone modifications (H3K9me2)	6	8
Q9LG11	Histone acetyltransferase HAC4 OS=Arabidopsis thaliana GN=HAC4 PE=2 SV=2	Acetylates histones, giving a specific tag for transcriptional activation.	4	34
Q9LE42	Histone acetyltransferase HAC5 OS=Arabidopsis thaliana GN=HAC5 PE=2 SV=1	Acetylates histones, giving a specific tag for transcriptional activation.	12	37
Q9FJT8	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit OS=Arabidopsis thaliana GN=HAG2 PE=2 SV=1	Acetylates 'Lys-12' of histone H4	9	14
Q9M2Z2	COMPASS-like H3K4 histone methylase component WDR5A OS=Arabidopsis thaliana GN=T16K5.10 PE=4 SV=1	Binds to target loci chromatin, increasing H3K4 trimethylation and causing activation of the gene	10	4
Q9SGH2	Methyl-CpG-binding domain-containing protein 9 OS=Arabidopsis thaliana GN=MBD9 PE=2 SV=1	Probable transcriptional regulator that acts as a histone acetyltransferase.	48	10
F4IHS2	Chromatin structure-remodeling complex protein SYD OS=Arabidopsis thaliana GN=SYD PE=1 SV=1	Catalytic component of the chromatin structure-remodeling complex (RSC), which is involved in transcription regulation and nucleosome positioning.	11	5
F4JTF6	Putative chromatin remodeling factor OS=Arabidopsis thaliana GN=PKR2 PE=4 SV=1	Chromatin remodeling factor that represses the expression of embryonic trait genes upon and after seed germination	8	9
Q9FJE8	Probable histone H2A.7 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g59870 PE=1 SV=1	Core component of nucleosome	15	16
Q8RXS6	DNA helicase INO80 OS=Arabidopsis thaliana GN=INO80 PE=2 SV=2	DNA helicase and probable main scaffold component of the INO80 complex which remodels chromatin by shifting nucleosomes and is involved in DNA repair.	5	10
F4IV99	Protein CHROMATIN REMODELING 5 OS=Arabidopsis thaliana GN=CHR5 PE=3 SV=1	DNA-binding helicase that specifically binds to the promoter of target genes, leading to chromatin remodeling, possibly by promoting deposition of histone H3.3	8	7
Q9FIY7	Putative SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 3-like 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g43530 PE=3 SV=1	Possesses intrinsic ATP-dependent nucleosome-remodeling activity. This activity may be required for DNA repair	5	3
F4I8S3	SNF2 domain-containing protein CLASSY 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=CLSY3 PE=1 SV=1	Probable chromatin remodeling factor	31	9

Q9FGW9	Transcription factor GTE10 OS=Arabidopsis thaliana GN=GTE10 PE=1 SV=2	Acts as a negative regulator in plant response to changes in environmental conditions through the control of ABA-regulated gene expression.	5	3
F4HW51	Protein CHROMATIN REMODELING 20 OS=Arabidopsis thaliana GN=ATRX PE=2 SV=2	Facilitates DNA replication in multiple cellular environments and is required for efficient replication	6	3
F4I2H2	Switch 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=SWI2 PE=3 SV=1	May be involved in early DNA damage response. Probable chromatin remodeling factor	6	11
F4KGY6	Protein REVEILLE 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=RVE1 PE=2 SV=1	Morning-phased transcription factor integrating the circadian clock and auxin pathways.	10	4
Q9FKS4	Serine/threonine-protein kinase ATR OS=Arabidopsis thaliana GN=ATR PE=2 SV=2	Plays a central role in cell-cycle regulation by transmitting DNA damage signals to downstream effectors of cell-cycle progression	8	19
Q9M3G7	Serine/threonine-protein kinase ATM OS=Arabidopsis thaliana GN=ATM PE=2 SV=1	Plays a central role in the perception and response to both stress-induced damage in somatic cells and developmentally programmed DNA damage during meiosis.	41	30
O23530	Protein SUPPRESSOR OF npr1-1, CONSTITUTIVE 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=SNC1 PE=1 SV=3	That triggers a defense system including the hypersensitive response, which restricts the pathogen growth. Regulated by RNA silencing.	10	7
O48844	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog A OS=Arabidopsis thaliana GN=RPN2A PE=1 SV=1	Acts as a regulatory subunit of the 26 proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins	13	14
O24412	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog A	Acts as a regulatory subunit of the 26 proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins	9	11
Q9LT08	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 homolog OS=Arabidopsis thaliana GN=RPN11 PE=1 SV=1	Acts as a regulatory subunit of the 26 proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins	4	3
F4I7K3	Protein TRF-like 3	DNA binding	3	14
F4J6V1	Duplicated homeodomain-like superfamily protein	DNA binding	8	7
F4KCX4	SWIB/MDM2, Plus-3 and GYF domain-containing protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g23480 PE=4 SV=1	DNA binding	4	46
Q9SK57	Putative retroelement pol polyprotein OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g10780 PE=4 SV=1	DNA integration	17	16

Q9LNC4	Transcription factor GTE4 OS=Arabidopsis thaliana GN=GTE4 PE=2 SV=1	Involved in the activation and maintenance of cell division in the meristems and by this controls cell numbers in differentiated organs.	6	14
Q9ZP54	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PARP1 PE=1 SV=2	Involved in the base excision repair (BER) pathway, by catalyzing the poly(ADP-ribosyl)ation of a limited number of acceptor proteins involved in chromatin architecture and in DNA metabolism.	17	30
Q9SN39	Pentatricopeptide repeat-containing protein DOT4, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=DOT4 PE=2 SV=1	Plays a major role in single RNA editing events in chloroplasts.	11	6
Q8LPQ9	Flowering time control protein FPA OS=Arabidopsis thaliana GN=FPA PE=2 SV=2	Plays a role in the regulation of flowering time	3	15
O22148	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g45230 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	20	31
Q9ZQQ6	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g14430 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	8	19
Q9SKJ4	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g25550 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	13	15
O64712	Putative reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g02650 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	1	4
F4HPY3	RNA-directed DNA polymerase (Reverse transcriptase)-related protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g60720 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	6	4
O23410	Reverse transcriptase like protein OS=Arabidopsis thaliana GN=dl3835c PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	7	18
Q9SK98	Very similar to retrotransposon reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=F12K8.9 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	17	11
Q0WPH2	At1g15940		8	7
Q9SD34	Zinc finger CCCH domain-containing protein 44 OS=Arabidopsis thaliana		6	12

10.4 Anotación de las proteínas asociadas al Minicromosoma Viral de Síntomas (no presentes en remisión)

Código	Descripción de la Proteína	Función	#Péptidos
F4KEM0	Protein STICHEL-like 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g18820 PE=3 SV=1	DNA Binding	5
P92986	Snapdragon myb protein 305 homolog	DNA Binding	5
Q84JB7	DEK domain-containing chromatin associated protein	DNA Binding	9
Q9M2Q0	DNA-binding bromodomain- containing protein OS=Arabidopsis thaliana GN=T10K17.190 PE=4 SV=1	DNA binding protein	4
Q9M9S7	F14L17.12 protein OS=Arabidopsis thaliana GN=F14L17.12 PE=4 SV=1	DNA binding protein	7
Q8LCB3	Putative uncharacterized protein	DNA binding protein	12
F4I129	Putative uncharacterized protein	DNA binding protein	8
Q8VY11	DNA gyrase B3 OS=Arabidopsis thaliana GN=GYRB3 PE=2 SV=1	DNA topological change	7
Q9FJ79	DNA topoisomerase 1 beta OS=Arabidopsis thaliana GN=TOP1BETA PE=1 SV=1	DNA topological change	4
Q9FXC8	DNA polymerase alpha subunit B OS=Arabidopsis thaliana PE=3 SV=1	May play an essential role at the early stage of chromosomal DNA replication by coupling the polymerase alpha/primase complex to the cellular replication machinery.	5
C0LU16	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 21 OS=Arabidopsis thaliana GN=MED21 PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	7
F4I4P3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23 OS=Arabidopsis thaliana GN=MED23 PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	4
Q9LT25	Pre-mRNA-processing protein 40C OS=Arabidopsis thaliana GN=MED35C PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	3
Q9SHV7	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15c OS=Arabidopsis thaliana GN=MED15C PE=2 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	15
Q8H1B3	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37b OS=Arabidopsis thaliana GN=MED37B PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	4

P92969	DNA-directed RNA polymerase 1, mitochondrial	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.	8
O24600	DNA-directed RNA polymerase 3, chloroplasti	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.	2
Q8H1E1	DNA-directed RNA polymerase II protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g08540 PE=2 SV=1	DNA-directed RNA polymerase activity	6
Q9SZC2	MYB transcription factor OS=Arabidopsis thaliana GN=F17M5.210 PE=2 SV=1	Positive regulation of transcription, DNA-templated	5
Q9C616	Probable transcription factor KAN2 OS=Arabidopsis thaliana GN=KAN2 PE=2 SV=1	Probable transcription factor that regulates lateral organ polarity.	1
Q9LYP5	Putative two-component response regulator ARR21 OS=Arabidopsis thaliana GN=ARR21 PE=2 SV=3	Putative RNA polymerase II subunit B1 C-terminal domain (CTD) phosphatase involved in RNA polymerase II transcription regulation.	4
F4I9Y7	Transcription elongation factor SPT6-like protein OS=Arabidopsis thaliana GN=GTB1 PE=4 SV=1	Regulation of DNA-templated transcription, elongation	20
Q93YS6	Transcription factor GTE9 OS=Arabidopsis thaliana GN=GTE9 PE=1 SV=1	Regulation of transcription, DNA-templated	17
Q00IB6	RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=CPL4 PE=1 SV=1	Required for normal plant growth.	2
F4K4L7	Transcription initiation factor TFIID subunit 4b OS=Arabidopsis thaliana GN=TAF4B PE=1 SV=1	TAFs are components of the transcription factor IID (TFIID) complex that is essential for mediating regulation of RNA polymerase transcription.	9
Q9SYZ9	Transcription initiation factor TFIID subunit 8 OS=Arabidopsis thaliana GN=TAF8 PE=1 SV=1	TAFs are components of the transcription factor IID (TFIID) complex that is essential for mediating regulation of RNA polymerase transcription.	3
Q93ZW3	RNA polymerase II core binding	TFIIH-class transcription factor binding	5
F4K1B1	Putative RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase RPAP2 homolog OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g26760 PE=2 SV=1	Transcription	9
Q8L7T6	Probable inactive lysine-specific demethylase JMJ19 OS=Arabidopsis thaliana GN=JMJ19 PE=2 SV=1	Transcription factor activity	3
O22264	Transcription factor MYB12 OS=Arabidopsis thaliana GN=MYB12 PE=2 SV=1	Transcription factor that activates the expression of CHS, CHI, F3H and FLS1. Flavonol-specific activator of flavonoid biosynthesis.	2

Q9SWA6	SNI1	transcription regulatory region DNA binding	6
Q9C9A0	At1g71080/F23N20_7 OS=Arabidopsis thaliana GN=F23N20.7 PE=1 SV=1	translation elongation factor activity	7
O23255	Adenosylhomocysteinase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=SAHH1 PE=1 SV=1	Adenosylhomocysteine is a competitive inhibitor of S-adenosyl-L-methionine-dependent methyl transferase reactions; therefore adenosylhomocysteinase may play a key role in the control of methylations via regulation of the intracellular concentration of adenosylhomocysteine. Required for DNA methylation-dependent gene silencing.	8
Q9LYA9	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa a, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=CSP41A PE=1 SV=1	Binds and cleaves RNA, particularly in stem-loops.	1
Q9SU24	Origin of replication complex subunit 1B OS=Arabidopsis thaliana GN=ORC1B PE=1 SV=1	Component of the origin recognition complex (ORC) that binds origins of replication. It has a role in both chromosomal replication and mating type transcriptional silencing.	5
O22895	SWR1-complex protein 4	Component of the SWR1 complex which mediates the ATP-dependent exchange of histone H2A for the H2A variant HZT1 leading to transcriptional regulation of selected genes by chromatin remodeling.	2
Q9SIW2	Putative chromatin remodeling protein OS=Arabidopsis thaliana GN=DRD1 PE=4 SV=1	Cooperates with Pol IV and Pol V to regulates RNA- and RNAi- (RNA interference) directed non-CpG de novo DNA methylation on cytosine of genes targeted for silencing and enhancers, also known as siRNA-directed DNA methylation (RdDM), thus leading to epigenetic modification of the genome and promoting/maintaining heterochromatin	4
Q8VYZ0	E3 ubiquitin-protein ligase ORTHRUS 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=ORTH2 PE=1 SV=1	E3 ubiquitin-protein ligase. Participates in CpG methylation-dependent transcriptional regulation and epigenetic transcriptional silencing.	27
F4I6G4	Lysine-specific demethylase JMJ18 H3K4 OS=Arabidopsis thaliana GN=JMJ18 PE=2 SV=1	Histone demethylase that demethylates 'Lys-4' (H3K4me) of histone H3 with a specific activity for H3K4me3 and H3K4me2.	3

Q9SUE7	Histone-lysine N-methyltransferase ATX4 OS=Arabidopsis thaliana GN=ATX4 PE=2 SV=3	Histone methyltransferase	1
A9QA58	Histone-lysine N-methyltransferase ATXR7	Histone methyltransferase involved in regulation of flowering time	5
Q9FF80	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH1	Histone methyltransferase. Methylates 'Lys-9' of histone H3. H3 'Lys-9' methylation represents a specific tag for epigenetic transcriptional repression.	9
Q8VZ17	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH6 OS=Arabidopsis thaliana GN=SUVH6 PE=2 SV=2	Histone methyltransferase. Methylates 'Lys-9' of histone H3. H3 'Lys-9' methylation represents a specific tag for epigenetic transcriptional repression. Seems to act preferentially on dsMRNA	2
Q8GZB6	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH4 OS=Arabidopsis thaliana GN=SUVH4 PE=1 SV=2	Histone methyltransferase. Methylates 'Lys-9' of histone H3. H3 'Lys-9' methylation represents a specific tag for epigenetic transcriptional repression. The silencing mechanism via DNA CpNpG methylation requires the targeting of chromomethylase CMT3 to methylated histones	4
Q9T011	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=MET3 PE=3 SV=1	MET, Maintains chromatin methylation	2
F4JCS8	BAH and TFIIS domain-containing protein;	Negative regulation of translation involved in gene silencing by miRNA	8
O65312	Histone-lysine N-methyltransferase MEDEA H3K27	Polycomb group (PcG) protein. Catalytic subunit of some PcG multiprotein complex, which methylates 'Lys-27' of histone H3, leading to transcriptional repression of the affected target genes.	3
F4JLS1	Lysine-specific histone demethylase 1 homolog 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=LDL3 PE=1 SV=1	Probable histone demethylase that reduces the levels of histone H3 'Lys-4' methylation in chromatin	6
Q8LRK8	Histone deacetylase 18	Responsible for the deacetylation of lysine residues on the N-terminal part of the core histones (H2A, H2B, H3 and H4).	6
Q9FML2	Histone deacetylase 6	Responsible for the deacetylation of lysine residues on the N-terminal part of the core histones (H2A, H2B, H3 and H4). Plays a role in transgene silencing.	2
Q9LXW7	Endoribonuclease Dicer homolog 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=DCL3 PE=1 SV=2	Ribonuclease (RNase) III involved in RNA-mediated post-transcriptional gene silencing (PTGS). Plays a role in antiviral RNA silencing.	153

Q9SNC0	Methyl-CpG-binding domain-containing protein 5 OS=Arabidopsis thaliana GN=MBD5 PE=1 SV=1	Transcriptional regulator that binds CpG islands in promoters where the DNA is methylated at position 5 of cytosine within CpG dinucleotides. In addition, binds specifically methylated m ₅ CpNpN but not m ₅ CpNpG (N is A, T or C).	1
Q9C5X9	Histone acetyltransferase HAC1 OS=Arabidopsis thaliana GN=HAC1 PE=1 SV=2	Acetyltransferase enzyme. Acetylates histones, giving a specific tag for transcriptional activation.	88
Q9STM3	Lysine-specific demethylase H3K27 REF6 OS=Arabidopsis thaliana GN=REF6 PE=1 SV=1	Histone demethylase that demethylates 'Lys-27' (H3K27me) of histone H3. Demethylates both tri- (H3K27me ₃) and di-methylated (H3K27me ₂) H3K27me.	27
Q84WW6	Histone-lysine N-methyltransferase ASHH1 OS=Arabidopsis thaliana GN=ASHH1 PE=1 SV=1	Histone methyltransferase involved in regulation of flowering time. Required for the expression of the SOC1/AGL20 gene. Required for histone H3 trimethylation on 'Lys-4' H3K4me ₃ at the SOC1 locus. Prevents trimethylation on 'Lys-27' H3K27me ₃ at the same locus.	3
O23372	Probable histone-lysine N-methyltransferase ATXR3 OS=Arabidopsis thaliana GN=ATXR3 PE=2 SV=2	Histone methyltransferase specifically required for trimethylation of 'Lys-4' of histone H3 (H3K4me ₃)	5
O04544	At1g70000 OS=Arabidopsis thaliana GN=F20P5.26 PE=2 SV=1	Positive regulation of histone acetylation	1
Q9C7B1	Telomere repeat-binding protein 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=TRP3 PE=1 SV=1	Binds specifically to the plant telomeric double-stranded DNA sequences.	23
Q56YN8	Structural maintenance of chromosomes protein 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=SMC3 PE=2 SV=1	Central component of cohesin, a complex required for chromosome cohesion during the cell cycle.	1
Q9C5Y4	Structural maintenance of chromosomes protein 2-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=SMC2-1 PE=2 SV=2	Central component of the condensin complex, a complex required for conversion of interphase chromatin into mitotic-like condense chromosomes.	8
A5HEI1	Sister chromatid cohesion 2	Centromere complex assembly	10
Q9FQ20	Sister chromatid cohesion 1 protein 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=SYN2 PE=2 SV=2	Chromosome segregation; double-strand break repair	5
Q84JG2	SWI/SNF complex subunit SWI3B OS=Arabidopsis thaliana GN=SWI3B PE=1 SV=1	Component of a multiprotein complex equivalent of the SWI/SNF 3complex, an ATP-dependent chromatin-remodeling complex, which is required for the positive and negative regulation of gene expression of a large number of genes.	3
O23628	Histone H2A variant 1	Core component of nucleosome.	20

Q9T0H7	Histone H2A.8 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g13570 PE=1 SV=1	Core component of nucleosome.	5
O23629	Histone H2B.6	Core component of nucleosome.	18
P59169	Histone H3.3	Core component of nucleosome.	26
P59259	Histone H4	Core component of nucleosome.	26
Q9C895	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1-like 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=HUB2 PE=2 SV=2	E3 ubiquitin-protein ligase that monoubiquitinates H2B to form H2BK143ub1.	5
F4JY24	ISWI chromatin-remodeling complex ATPase CHR17	Possesses intrinsic ATP-dependent nucleosome-remodeling activity. Constitutes the catalytic subunit of several complexes capable of forming ordered nucleosome arrays on chromatin	5
Q9SZP1	Transcription repressor MYB4 OS=Arabidopsis thaliana GN=MYB4 PE=1 SV=1	Transcription repressor involved in regulation of protection against UV.	6
O48686	Paired amphipathic helix protein Sin3-like 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=SNL3 PE=1 SV=3	Acts as a transcriptional repressor. Interacts with ERF7 to repress genes in abscisic acid and drought stress responses.	5
Q9FN19	AT5g67320/K8K14_4 transcription corepressor activity OS=Arabidopsis thaliana GN=HOS15 PE=2 SV=1	Histone deacetylation; Response to cold	3
Q500Z7	At5g40550 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g40550 PE=2 SV=1	Histone H3/H3 acetylation; Response to salt stress	4
Q5YDB5	RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like 2	Multifunctional regulator that modulates plant growth, stress, and phytohormones responses.	2
Q8LL04	RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=CPL3 PE=1 SV=2	Negative regulator of stress gene transcription involved in abscisic acid (ABA) mediated signaling pathway and cold resistance	7
O80883	MYB101; factor transcription	Positive regulation of abscisic acid-activated signaling pathway	4
Q9LVS0	MYB transcription factor OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g47390 PE=2 SV=1	Response abscisic acid, ethylene, jasmonic acid, salicylic acid.	3
Q8RWV9	Putative uncharacterized protein At5g08450	Response stress	12
O22446	Histone deacetylase 19	Responsible for the deacetylation of lysine residues on the N-terminal part of the core histones (H2A, H2B, H3 and H4). HDA19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response.	3
Q3MJQ9	BC1 OS=Pepper golden mosaic virus PE=4 SV=1	Movement Protein Virus	9

H2DFC9	Replication enhancer protein OS=Pepper golden mosaic virus GN=AC3 PE=4 SV=1	ReN Protein Virus	8
Q9ZUF0	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g05980 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	8
O64473	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g19100 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	6
O81068	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g28980 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	10
Q9XIH8	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g16110 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	3
O81441	Putative reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=T24H24.17 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	22
Q9SZ87	RNA-directed DNA polymerase-like protein OS=Arabidopsis thaliana GN=F17A8.60 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	4
Q9FIB6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 homolog A OS=Arabidopsis thaliana GN=RPN5A PE=1 SV=1	Acts as a regulatory subunit of the 26 proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins.	5
O24412	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog A	Acts as a regulatory subunit of the 26 proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins.	9
P30186	Proteasome subunit alpha type-7-A OS=Arabidopsis thaliana GN=PAD1 PE=1 SV=1	Mediates the association of the SCF(TIR1) E3 ubiquitin ligase complex with the proteasome.	1
O24616	Proteasome subunit alpha type-7-B OS=Arabidopsis thaliana GN=PAD2 PE=1 SV=2	Mediates the association of the SCF(TIR1) E3 ubiquitin ligase complex with the proteasome.	3
Q9MAK9	26S protease regulatory subunit S10B homolog B	The 26S protease is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins.	7
Q9FH51	Protein FLX-like 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=FLXL4 PE=1 SV=1	Involved in FLC activation and flowering time control, but has no transcriptional activation activity.	10
Q9C7E4	Putative uncharacterized protein F13K9.19 OS=Arabidopsis thaliana GN=F13K9.19 PE=3 SV=1	Nucleotidyltransferase activity; RNA Binding	3
Q9SI33	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g04930 PE=4 SV=1	Phosphoprotein phosphatase activity	4

P41916	GTP-binding nuclear protein Ran-1; protein involved in nucleocytoplasmic transport	GTP-binding protein involved in nucleocytoplasmic transport. Required for the import of protein into the nucleus and also for RNA export. Involved in chromatin condensation and control of cell cycle	4
Q9M0K4	Transcription factor LAF1 OS=Arabidopsis thaliana GN=LAF1 PE=1 SV=2	Transcription factor that promotes photomorphogenesis in the light by participating in the transmission of phytochrome A (phyA) signals to downstream responses.	10
O82496	T12H20.15 protein OS=Arabidopsis thaliana GN=T12H20.15 PE=4 SV=1		4

10.5 Anotación de las proteínas asociadas al Minicromosoma Viral en Remisión (No presentes en tejido con síntomas).

Código	Descripción de la Proteína	Función	#Péptidos
Q9LZ03	DNA topoisomerase 6 subunit A OS=Arabidopsis thaliana GN=TOP6A PE=1 SV=1	Component of the DNA topoisomerase VI involved in chromatin organization and progression of endoreduplication cycles.	21
O48523	DNA-binding bromodomain-containing protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g42150 PE=4 SV=1	DNA Binding	9
Q9LG02	Putative high mobility group B protein 11 OS=Arabidopsis thaliana GN=HMGB11 PE=3 SV=2	Binds preferentially DNA with A/T-rich content	17
Q9C5V6	DNA topoisomerase 6 subunit B OS=Arabidopsis thaliana GN=TOP6B PE=1 SV=1	Component of the DNA topoisomerase VI involved in chromatin organization and progression of endoreduplication cycles.	4
Q9SKI4	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit A OS=Arabidopsis thaliana GN=RPA1A PE=1 SV=1	Component of the replication protein A complex (RPA) required for DNA recombination, repair and replication.	7
Q9FLR5	Structural maintenance of chromosomes protein 6A OS=Arabidopsis thaliana GN=SMC6A PE=2 SV=1	Core component of the SMC5-SMC6 complex that promotes sister chromatid alignment after DNA damage and facilitates double-stranded DNA breaks (DSBs) repair via homologous recombination between sister chromatids.	7
Q9LHS5	Cell division related protein-like OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g06110 PE=4 SV=1	DNA Binding	11
F4K4Y5	DEK domain-containing chromatin associated protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g55660 PE=1 SV=1	DNA Binding	20
A8MRL4	Homeodomain-like superfamily protein	DNA Binding	7
Q9XEB2	Homeodomain-like superfamily protein OS=Arabidopsis thaliana GN=F4H6.10 PE=4 SV=1	DNA Binding	5
F4J7J5	Myb domain protein 4r1	DNA Binding	22
Q94FL6	MYB124	DNA Binding	6
Q5XUY3	Myb-like HTH transcriptional regulator family protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g58340 PE=2 SV=1	DNA Binding	6
Q9CAY2	Putative cell division related protein; 50012-47994 OS=Arabidopsis thaliana GN=F24K9.12 PE=4 SV=1	DNA Binding	22

O65898	Putative MYB transcription factor	DNA Binding	8
Q9XE44	Putative retroelement pol polyprotein OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g07660 PE=4 SV=1	DNA Binding	14
Q9C8N6	DNA polymerase type I, putative 54894-56354 OS=Arabidopsis thaliana GN=F7P12.3 PE=4 SV=1	DNA Syntesis	8
O82265	Sister-chromatid cohesion protein 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=SCC3 PE=1 SV=2	Essential component of cohesin complex, a complex required for the cohesion of sister chromatids after DNA replication.	4
F4JTF2	Uncharacterized protein	Establishment of Sister Chromatid Cohesion	66
B3H5K3	Uncharacterized protein	Establishment of Sister Chromatid Cohesion.	7
F4I6M1	DNA polymerase I A, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=POLIA PE=2 SV=1	In addition to polymerase activity, this DNA polymerase 5' to 3' exonuclease activity	3
Q9SUC3	Protein POLLENLESS 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=MS5 PE=2 SV=2	Involved in the regulation of cell division after male meiosis I and II to facilitate exit from meiosis and transition to G1	8
Q9FXC8	DNA polymerase alpha subunit B OS=Arabidopsis thaliana PE=3 SV=1	May play an essential role at the early stage of chromosomal DNA replication by coupling the polymerase alpha/primase complex to the cellular replication machinery.	5
Q9SJW9	CDT1-like protein a, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=CDT1A PE=1 SV=1	Member of the pre-replication complex. Component of the plastid division machinery.	17
Q9LVN7	DNA polymerase delta catalytic subunit	This polymerase possesses two enzymatic activities: DNA synthesis (polymerase) and an exonucleolytic activity that degrades single-stranded DNA in the 3'- to 5'-direction.	14
F4I0K2	Fructokinase-like 2, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=FLN2 PE=1 SV=2	Acts as a component of the transcriptionally active plastid chromosome that is required for plastid gene expression.	10
F4JC20	FIP1[III]-like protein OS=Arabidopsis thaliana GN=FIPS3 PE=1 SV=1	Component of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex that plays a key role in pre-mRNA 3'-end formation, recognizing the AAUAAA signal sequence and interacting with poly(A) polymerase and other factors to bring about cleavage and poly(A) addition.	4

H3K2Y6	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 OS=Arabidopsis thaliana GN=MED12 PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	3
F4IN69	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 33B OS=Arabidopsis thaliana GN=MED33B PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	16
Q8RWA2	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 9 OS=Arabidopsis thaliana GN=MED9 PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	5
F4KFC7	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 26c OS=Arabidopsis thaliana GN=MED26C PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes.	25
Q9FT73	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 34 OS=Arabidopsis thaliana GN=MED34 PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. 3'-5' DNA helicase that may play a role in the repair of DNA.	11
O23310	Nuclear transcription factor Y subunit B-3 OS=Arabidopsis thaliana GN=NFYB3 PE=2 SV=1	Component of the NF-Y/HAP transcription factor complex. The NF-Y complex stimulates the transcription of various genes by recognizing and binding to a CCAAT motif in promoters.	7
Q9FGR0	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=CPSF160 PE=1 SV=2	CPSF plays a key role in pre-mRNA 3'-end formation, recognizing the AAUAAA signal sequence and interacting with poly(A)polymerase and other factors to bring about cleavage and poly(A) addition.	4
Q9LKF9	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=CPSF100 PE=1 SV=2	CPSF plays a key role in pre-mRNA 3'-end formation, recognizing the AAUAAA signal sequence and interacting with poly(A)polymerase and other factors to bring about cleavage and poly(A) addition.	7
F4JXF8	DNA-directed RNA polymerase	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.	10
P92969	DNA-directed RNA polymerase 1, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=RPOT1 PE=2 SV=1	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.	4

F4I366	DNA-directed RNA polymerase I subunit 2	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.	4
P18616	DNA-directed RNA polymerase II subunit 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=NRPB1 PE=1 SV=3	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.	11
P38420	DNA-directed RNA polymerase II subunit 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=NRPB2 PE=1 SV=2	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.	6
Q1PEP5	Nucleolin 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=NUCL2 PE=2 SV=1	Involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly.	5
Q9SVY0	DNA-directed RNA polymerase OS=Arabidopsis thaliana GN=F15B8.150 PE=3 SV=1	Largest and catalytic core component of RNA polymerase I which synthesizes ribosomal RNA precursors.	19
C0SUT9	Putative lysine-specific demethylase JMJ16 OS=Arabidopsis thaliana GN=JMJ16 PE=2 SV=1	May function as histone H3 lysine demethylase and be involved in regulation of gene expression.	6
C0SUT9	Putative lysine-specific demethylase JMJ16	May function as histone H3 lysine demethylase and be involved in regulation of gene expression.	6
Q9STN3	Putative transcription elongation factor SPT5 homolog 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g08350 PE=1 SV=2	May regulate transcription elongation by RNA polymerase II. May enhance transcriptional pausing at sites proximal to the promoter, which may in turn facilitate the assembly of an elongation competent RNA polymerase II complex	5
O80770	Putative transcription elongation factor SPT5 homolog 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g34210 PE=3 SV=2	May regulate transcription elongation by RNA polymerase II. May enhance transcriptional pausing at sites proximal to the promoter, which may in turn facilitate the assembly of an elongation competent RNA polymerase II complex	11
Q9LMT2	Nuclear poly(A) polymerase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PAPS1 PE=1 SV=1	Polymerase that creates the 3'-poly(A) tail of mRNA's	3
Q9AT76	Agamous-like MADS-box protein AGL27 OS=Arabidopsis thaliana GN=AGL27 PE=1 SV=1	Probable transcription factor involved in the negative regulation of flowering time	7
Q8H181	Trihelix transcription factor GTL2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g28300 PE=2 SV=1	Probable transcription factor that binds specific DNA sequence.	3

Q9LS28	Transcription factor GTE12 OS=Arabidopsis thaliana GN=GTE12 PE=2 SV=2	Regulation of transcription	3
Q8H1D7	Transcription factor GTE5, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=GTE5 PE=1 SV=1	Regulation of transcription	22
Q9LK27	Transcription factor GTE8 OS=Arabidopsis thaliana GN=GTE8 PE=2 SV=2	Regulation of transcription	5
Q9MAN4	uncharacterized At2g02060 regulation of transcription OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g02061 PE=4 SV=1	Regulation of transcription	11
O64547	YUP8H12R.36; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	Regulation of transcription	6
Q940Y3	AT-rich interactive domain-containing protein 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=ARID3 PE=1 SV=1	Regulation transcription	3
Q9LIA4	Protein RIK OS=Arabidopsis thaliana GN=RIK PE=1 SV=2	RNA Binding	27
O24621	RNA polymerase sigma factor sigC OS=Arabidopsis thaliana GN=SIGC PE=2 SV=1	Sigma factors are initiation factors that promote the attachment of plastid-encoded RNA polymerase (PEP) to specific initiation sites and are then released	7
Q9ZSL6	RNA polymerase sigma factor sigD, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=SIGD PE=2 SV=1	Sigma factors are initiation factors that promote the attachment of plastid-encoded RNA polymerase (PEP) to specific initiation sites and are then released.	3
Q9ZNX9	RNA polymerase sigma factor sigE, chloroplastic/mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=SIGE PE=1 SV=1	Sigma factors are initiation factors that promote the attachment of plastid-encoded RNA polymerase (PEP) to specific initiation sites and are then released.	8
Q9AST1	Transcription initiation factor TFIID subunit 15 OS=Arabidopsis thaliana GN=TAF15 PE=1 SV=1	TAFs are components of the transcription factor IID (TFIID) complex that is essential for mediating regulation of RNA polymerase transcription.	4
Q6S7B0	Transcription initiation factor TFIID subunit 5 OS=Arabidopsis thaliana GN=TAF5 PE=1 SV=1	TAFs are components of the transcription factor IID (TFIID) complex that is essential for mediating regulation of RNA polymerase transcription.	27
O81787	Putative uncharacterized protein AT4g35540 OS=Arabidopsis thaliana GN=F8D20.50 PE=4 SV=1	TFIIB-class transcription factor binding	9
Q6A333	Protein ALWAYS EARLY 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=ALY2 PE=1 SV=1	Transcription	4

P48731	Homeobox protein ATH1 OS=Arabidopsis thaliana GN=ATH1 PE=1 SV=1	Transcription factor which may be involved in the signal transduction pathway downstream of the COP1 gene.	8
F4IN86	Cyclin/Brf1-like TBP-binding protein OS=Arabidopsis thaliana GN=MEE65 PE=4 SV=1	Transcription initiation from RNA polymerase III promoter	4
Q9C6K3	Duplicated homeodomain-like superfamily protein OS=Arabidopsis thaliana GN=F7O12.5 PE=4 SV=1	Transcription regulatory region DNA binding	5
Q9FMS5	PHD finger protein MALE STERILITY 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=MS1 PE=1 SV=1	Transcriptional activator required for anther and post-meiotic pollen development and maturation.	4
P62598	Two-component response regulator ARR12 OS=Arabidopsis thaliana GN=ARR12 PE=2 SV=2	Transcriptional activator that binds specifically to the DNA sequence 5'-[AG]GATT-3'. Functions as a response regulator involved in His-to-Asp phosphor relay signal transduction system.	12
A8MS85	Transcription elongation factor SPT6-like protein	Translation elongation factor activity	33
F4I6D6	RNA polymerase I specific transcription initiation factor RRN3 protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g30590 PE=4 SV=1	Translation initiation factor activity	10
Q9SRH9	Paired amphipathic helix protein Sin3-like 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=SNL1 PE=1 SV=2	Acts as a transcriptional repressor. A histone deacetylase (HDAC) activity is required for transcription repression.	20
Q9SKN2	Double-stranded RNA-binding protein 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=DRB2 PE=1 SV=1	Binds double-stranded RNA. May be involved in RNA-mediated silencing.	13
Q9ZUL5	Protein CHROMATIN REMODELING 19 OS=Arabidopsis thaliana GN=ETL1 PE=2 SV=1	DNA helicase that possesses intrinsic ATP-dependent nucleosome-remodeling activity and is both required for DNA repair and heterochromatin organization.	28
Q9LXN4	Protein HIRA OS=Arabidopsis thaliana GN=HIRA PE=1 SV=2	Histone chaperone involved in maintaining knox genes silencing throughout leaf development. May be involved in heterochromatic and euchromatic gene silencing.	4
O64752	Lysine-specific demethylase JMJ15 OS=Arabidopsis thaliana GN=JMJ15 PE=2 SV=1	Histone demethylase that demethylates 'Lys-4' (H3K4me) of histone H3 with a specific activity for H3K4me3.	5
Q9C5P4	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH3 OS=Arabidopsis thaliana GN=SUVH3 PE=2 SV=2	Histone methyltransferase. Methylates 'Lys-9' of histone H3. H3 'Lys-9' methylation represents a specific tag for epigenetic transcriptional repression.	3

O04379	Protein argonaute 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=AGO1 PE=1 SV=1	Involved in RNA-mediated post-transcriptional gene silencing (PTGS). Main component of the RNA-induced silencing complex (RISC) that binds to a short guide RNA such as microRNA (miRNA) or small interfering RNA (siRNA).	8
Q9LQ02	DNA-directed RNA polymerase IV subunit 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=NRPD1 PE=1 SV=1	Largest and catalytic component of RNA polymerase IV which mediates 24-nt short-interfering RNAs (siRNA) accumulation. Implicated in siRNA-directed heterochromatin formation through the action of DCL3 and AGO4, and subsequent DNA methylation-dependent silencing of targeted sequences. Essential component of a self-reinforcing loop coupling de novo DNA methylation to siRNA production.	14
P34881	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=DMT1 PE=1 SV=1	Maintains chromatin methylation; DMT	4
Q94F87	DNA (cytosine-5)-methyltransferase CMT2 OS=Arabidopsis thaliana GN=CMT2 PE=2 SV=3	May be involved in the CpXpG methylation and in gene silencing. CMT2	19
Q9SIV5	Zinc finger CCCH domain-containing protein 19 OS=Arabidopsis thaliana GN=NERD PE=1 SV=3	Plays a central role in integrating RNA silencing and chromatin signals in 21 nt siRNA-dependent DNA methylation on cytosine pathway leading to transcriptional gene silencing of specific sequences. Involved in a chromatin-based RNA silencing pathway that encompasses both post-transcriptional gene silencing (PTGS) (e.g. RDR1, RDR6 and AGO2) and transcriptional gene silencing (TGS)	9
Q9C587	Replication factor C subunit 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=RFC1 PE=2 SV=1	Plays a role as mediator of transcriptional gene silencing (TGS), DNA replication, DNA repair, hypersensitive response (HR) and telomere length regulation.	4
Q93ZG9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP53 OS=Arabidopsis thaliana GN=FKBP53 PE=1 SV=1	PPIases accelerate the folding of proteins. It catalyzes the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides (By similarity). Histone chaperone possibly involved in H3/H4 deposition to the nucleosome.	9

Q8W4D0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP71 OS=Arabidopsis thaliana GN=CYP71 PE=1 SV=1	PPIases accelerate the folding of proteins. It catalyzes the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides. Histone remodeling factor involved in chromatin-based gene silencing. Reinforces H3K27 methylation.	14
Q946J2	Histone-lysine N-methyltransferase SUVR1 OS=Arabidopsis thaliana GN=SUVR1 PE=2 SV=2	Probable inactive histone-lysine methyltransferase that acts as regulator of transcriptional gene silencing independently of histone H3K9 methylation. Contributes to transcriptional gene silencing at RNA-directed DNA methylation (RdDM)	12
Q9LZR5	Histone deacetylase HDT3 OS=Arabidopsis thaliana GN=HDT3 PE=1 SV=2	Probably mediates the deacetylation of lysine residues on the N-terminal part of the core histones (H2A, H2B, H3 and H4). Involved in the modulation of abscisic acid and stress-responsive genes.	3
Q9M658	Helicase protein MOM1 OS=Arabidopsis thaliana GN=MOM1 PE=1 SV=1	Required for the heritable maintenance of transcriptional gene silencing (TGS) in heterochromatin.	11
Q8GXJ1	Histone deacetylase 15	Responsible for the deacetylation of lysine residues on the N-terminal part of the core histones (H2A, H2B, H3 and H4).	16
Q9FYH1	Histone acetyltransferase HAC2 OS=Arabidopsis thaliana GN=HAC2 PE=2 SV=2	Acetyltransferase enzyme. Acetylates histones, giving a specific tag for transcriptional activation.	3
Q9FWQ5	Histone acetyltransferase HAC12	Acetyltransferase enzyme. Acetylates histones, giving a specific tag for transcriptional activation.	6
Q8L9Y2	Elongator complex protein 6 OS=Arabidopsis thaliana GN=ELP6 PE=1 SV=1	Acts as subunit of the RNA polymerase II elongator complex, which is a histone acetyltransferase component of the RNA polymerase II (Pol II) holoenzyme and is involved in transcriptional elongation.	4
Q9C950	Paf1C-like transcription factor OS=Arabidopsis thaliana GN=T7P1.17 PE=1 SV=1	Component of the PAF1 complex (PAF1C) which is involved in histone modifications such as methylation on histone H3 'Lys-4' (H3K4me3).	4
B5X0I6	Protein early flowering 8 OS=Arabidopsis thaliana GN=VIP6 PE=1 SV=1	Component of the PAF1 complex (PAF1C) which is involved in histone modifications such as methylation on histone H3 'Lys-4' (H3K4me3).	19
F4IDH2	Histone acetyltransferase HAC1 OS=Arabidopsis thaliana GN=HAC1 PE=4 SV=1	Histone acetyltransferase activity.	6

Q9LXD7	Histone acetyltransferase of the MYST family 2	Histone acetyltransferase which may be involved in transcriptional activation. Acetylates 'Lys-5' of histone H4 (H4K5ac).	4
Q67ZB6	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g63080 PE=2 SV=1	Histone demethylase activity (H3-R2 specific)/histone demethylase activity (H4-R3 specific).	3
Q9STM3	Lysine-specific demethylase REF6 OS=Arabidopsis thaliana GN=REF6 PE=1 SV=1	Histone demethylase that demethylates 'Lys-27' (H3K27me) of histone H3. Demethylates both tri-(H3K27me3) and di-methylated (H3K27me2) H3K27me.	33
F4IXE7	Histone H3 acetyltransferase IDM1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g14980 PE=4 SV=1	Histone H3 acetyltransferase that binds methylated DNA at chromatin sites lacking histone H3K4 di- or trimethylation and catalyzes H3K18 and H3K23 acetylation.	12
P0CB22	Histone-lysine N-methyltransferase ATX2 OS=Arabidopsis thaliana GN=ATX2 PE=2 SV=1	Histone methyltransferase.	15
Q9M364	Histone-lysine N-methyltransferase ATX3	Histone methyltransferase.	14
Q8GZ42	Histone-lysine N-methyltransferase ATX5 OS=Arabidopsis thaliana GN=ATX5 PE=2 SV=1	Histone methyltransferase.	3
Q9C5X4	Histone-lysine N-methyltransferase ATX1 OS=Arabidopsis thaliana GN=ATX1 PE=1 SV=2	Histone methyltransferase. Methylates 'Lys-4' of histone H3. H3 'Lys-4' methylation represents a specific tag for epigenetic transcriptional activation.	11
Q93ZB7	Transcription factor GTE11 OS=Arabidopsis thaliana GN=GTE11 PE=1 SV=1	Positive regulation of transcription.	6
Q9SZQ5	At4g29830 OS=Arabidopsis thaliana GN=F27B13.70 PE=1 SV=1	Required for histone H3 trimethylation on 'Lys-4' H3K4me3 and histone dimethylation on 'Lys-36' H3K36me2	5
Q9MA75	Transcription factor VIP1 OS=Arabidopsis thaliana GN=VIP1 PE=1 SV=1	Transcription activator that binds specifically to the VIP1 response elements (VREs) DNA sequence 5'-ACNGCT-3' found in some stress genes (e.g. TRX8 and MYB44), when phosphorylated/activated by MPK3.	6
F4JCS8	BAH and TFIIS domain-containing protein	Chromatin Binding	47
Q9SA19	Bromodomain transcription factor	Chromatin Binding	5
F4I548	HIT zinc finger and PAPA-1-like domain-containing protein	Chromatin remodeling	8
O22909	At2g47350; OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g47350 PE=2 SV=1	Chromatin remodeling	8
Q9S775	CHD3-type chromatin-remodeling factor PICKLE OS=Arabidopsis thaliana GN=PKL PE=1 SV=1	Chromatin remodeling factor that represses the expression of embryonic trait genes	10

Q9XI07	SWI/SNF complex subunit SWI3C OS=Arabidopsis thaliana GN=SWI3C PE=1 SV=1	Component of a multiprotein complex equivalent of the SWI/SNF complex, an ATP-dependent chromatin-remodeling complex, which is required for the positive and negative regulation of gene expression of a large number of genes.	14
P93045	Chromatin structure-remodeling complex protein BSH	Component of a multiprotein complex equivalent of the yeast SWI/SNF complex, an ATP-dependent chromatin-remodeling complex, which is required for the positive and negative regulation of gene expression of a large number of genes.	10
Q7X9V2	Protein PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIE1 PE=1 SV=1	Component of the SWR1 complex which mediates the ATP-dependent exchange of histone H2A for the H2A variant H2A.F/Z leading to transcriptional regulation of selected genes (e.g. FLC) by chromatin remodeling.	6
Q9SF55	Histone H2B.5 OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g09480 PE=1 SV=3	Core component of nucleosome	9
Q8W103	Protein CHROMATIN REMODELING 24 OS=Arabidopsis thaliana GN=CHR24 PE=2 SV=1	DNA helicase that acts as an essential component of the spindle assembly checkpoint (By similarity). Probable chromatin remodeling factor that regulate homologous recombination (HR) and non-homologous recombination (NHR).	5
Q6AWW7	At5g08780	Nucleosome assembly	5
Q9LP61	T1N15.25 nucleosome assembly OS=Arabidopsis thaliana PE=3 SV=1	Nucleosome assembly	7
G0XQD5	Truncated telomeric DNA binding protein isoform OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g67580 PE=2 SV=1	Nucleosome assembly	8
F4HW65	Protein STICHEL-like 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g14460 PE=1 SV=1	Nucleotide Binding	28
F4JRP8	Protein STICHEL-like 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g24790 PE=2 SV=1	Nucleotide Binding	6
F4KEM0	Protein STICHEL-like 4	Nucleotide Binding	16
Q9FF61	Putative SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 3-like 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g05130 PE=2 SV=1	Possesses intrinsic ATP-dependent nucleosome-remodeling activity. This activity may be required for transcriptional activation or repression of specific target promoters	3
F4K128	Probable ATP-dependent DNA helicase CHR23 OS=Arabidopsis thaliana GN=CHR23 PE=2 SV=1	Probable chromatin-remodeling factor	3

Q0H8D7	Nijmegen breakage syndrome 1 protein OS=Arabidopsis thaliana GN=NBS1 PE=1 SV=1	Component of the MRE11-RAD50-NBN complex (MRN complex) which plays a critical role in the cellular response to DNA damage and the maintenance of chromosome integrity.	19
Q6Q4D0	Protein TONSOKU OS=Arabidopsis thaliana GN=TSK PE=1 SV=2	Involved in structural and functional stabilization of chromatin and may represent a link between response to DNA damage and epigenetic gene silencing.	22
Q11207	Poly [ADP-ribose] polymerase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=PARP2 PE=2 SV=1	Involved in the base excision repair (BER) pathway, by catalyzing the poly(ADP-ribosyl)ation of a limited number of acceptor proteins involved in chromatin architecture and in DNA metabolism.	22
Q8W4M7	DNA repair helicase UVH6 OS=Arabidopsis thaliana GN=UVH6 PE=1 SV=1	Putative ATP-dependent 5'-3' DNA helicase involved in nucleotide excision repair (NER) of UV-damaged DNA.	11
Q6NQ88	Protein DAMAGED DNA-BINDING 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=DDB2 PE=1 SV=1	Required for DNA repair.	3
O65251	Flap endonuclease 1	Structure-specific nuclease with 5'-flap endonuclease and 5'-3' exonuclease activities involved in DNA replication and repair.	4
P92948	Cell division cycle 5-like protein OS=Arabidopsis thaliana GN=CDC5 PE=1 SV=2	Component of the MAC complex that probably regulates defense responses through transcriptional control and thereby is essential for plant innate immunity.	4
F4JGZ1	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16 OS=Arabidopsis thaliana GN=MED16 PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Involved in the regulation of the circadian clock, in the control of flowering time, in freezing- and osmotic-stress tolerance and in both salicylic acid- and jasmonate-mediated defense gene expression.	11
Q4V3C1	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8 OS=Arabidopsis thaliana GN=MED8 PE=1 SV=1	Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Regulator of both plant defense and flowering time.	3

Q9FIE3	Protein VERNALIZATION INSENSITIVE 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=VIN3 PE=1 SV=2	Plays a central role in vernalization by mediating the initial transcriptional repression of the homeotic gene FLC, a floral repressor, after a cold treatment.	3
Q8RWV9	Putative uncharacterized protein At5g08450; histone deacetylation	Response to acid abscic, salt stress	29
Q84TG2	At3g16350 transcription factor activity OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g16350 PE=2 SV=1	Response to ethylene, acid abscic, salt stress	15
Q9SJ38	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g05200 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	4
Q9SL12	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g05550 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	12
Q9ZQG1	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g15510 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	8
Q9SLE9	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g16680 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	6
Q9SHP2	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g17610 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	5
O82216	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g23880 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	18
O82276	Putative non-LTR retroelement reverse transcriptase OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g31080 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	23
Q9SZD8	Putative reverse transcriptase/RNA-dependent DNA polymerase OS=Arabidopsis thaliana GN=F19B15.120 PE=2 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	6
Q9C7N6	Reverse transcriptase, putative; 100033-105622 OS=Arabidopsis thaliana GN=F15D2.38 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	4
Q9C697	Reverse transcriptase, putative; 16838-20266 OS=Arabidopsis thaliana GN=T6B12.3 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	8
F4J6J5	RNA-directed DNA polymerase (Reverse transcriptase)-related protein OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g24255 PE=4 SV=1	RNA-directed DNA polymerase activity	8
P42745	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=UBC2 PE=2 SV=1	Accepts the ubiquitin from the E1 complex and catalyzes its covalent attachment to other proteins.	3

Q9LP45	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 homolog OS=Arabidopsis thaliana GN=RPN6 PE=1 SV=1	Component of the lid subcomplex of the 26S proteasome, a multiprotein complex involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins.	7
Q9SIV2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog A OS=Arabidopsis thaliana GN=RPN1A PE=1 SV=2	Component of the lid subcomplex of the 26S proteasome, a multiprotein complex involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins.	13
F4KBG0	Nuclear factor Y, subunit B13		14
C7SJ56	DUO pollen 3		23
Q9M300	Polynucleotide adenylyltransferase domain and RNA recognition motif-containing protein OS=Arabidopsis thaliana GN=T21J18_100 PE=3 SV=1		14
F4I7L1	Telomere repeat-binding factor 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g17520 PE=2 SV=2	Binds preferentially double-stranded telomeric repeats.	5
Q9C717	Protein FLX-like 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=FLXL3 PE=1 SV=1	Has no transcriptional activation activity.	5
Q9LHF5	VIN3-like protein 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=VIL1 PE=1 SV=1	Involved in both the vernalization and photoperiod pathways by regulating expression of the related floral repressors FLOWERING LOCUS C (FLC) and FLOWERING LOCUS M (FLM).	9
Q9LR65	Probable protein phosphatase 2C 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PPC6-6 PE=1 SV=1	May act as negative regulator of GCN5.	19
Q9SY69	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g10270 OS=Arabidopsis thaliana GN=GRP23 PE=1 SV=1	May function as a transcriptional regulator essential for early embryogenesis.	4
Q9FL74	Gb AAF34842.1; phosphoprotein phosphatase activity OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g54210 PE=4 SV=1	Phosphoprotein phosphatase activity	21
Q9CAE3	Protein FLOWERING LOCUS D OS=Arabidopsis thaliana GN=FLD PE=1 SV=1	Probable histone demethylase that promotes flowering independently of the photoperiod and vernalization pathways	6
P14713	Phytochrome B OS=Arabidopsis thaliana GN=PHYB PE=1 SV=1	Regulatory photoreceptor; Involved in the flowering time regulation	16
Q9SAK5	Myb family transcription factor APL OS=Arabidopsis thaliana GN=APL PE=2 SV=2	Transcription factor required for phloem identity. Has a dual role both in promoting phloem differentiation and in repressing xylem differentiation during vascular development.	12

Q9LTH4	Transcription factor BOA OS=Arabidopsis thaliana GN=BOA PE=2 SV=1	Transcription factor that is a critical component of the regulatory circuit of the circadian clock.	5
Q9FUY2	Transcriptional corepressor LEUNIG OS=Arabidopsis thaliana GN=LUG PE=1 SV=2	Transcription repressor subunit of the SEU-LUG transcriptional corepressor of the C class floral homeotic gene AGAMOUS during the early stages of floral meristem development.	4